

# THESE DE DOCTORAT DE

*L'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation  
et l'environnement*

Ecole interne AGROCAMPUS OUEST

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

*Spécialité : « Ecologie et Evolution »*

Par

**Aude ROCHEFORT**

**Le microbiote des graines de *Brassica napus* : assemblage,  
transmission et contribution à la réponse de la plante à un  
champignon pathogène du sol**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 26 novembre 2020

Unité de recherche : Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP)

UMR 1349 INRAE – Agrocampus Ouest – Université de Rennes 1 – 35653 LE RHEU

Thèse N° : B-341 2020-20

## Rapporteurs avant soutenance :

**Corinne VACHER** Directrice de recherche – INRAE UMR BioGeCo

**Pascal BONNARME** Directeur de recherche – INRAE UMR SayFood

## Composition du Jury :

Président : **Florence VAL** Professeure – Agrocampus Ouest

Examineurs : **Hervé SANGUIN** Chargé de recherche – CIRAD UMR BGPI  
**Corinne VACHER** Directrice de recherche – INRAE UMR BioGeCo  
**Pascal BONNARME** Directeur de recherche – INRAE UMR SayFood

Dir. de thèse : **Alain SARNIGUET** Directeur de recherche – INRAE UMR 1345 IRHS  
Co-dir. de thèse : **Matthieu BARRET** Chargé de recherche – INRAE UMR 1345 IRHS



*A ma sœur Cécile,  
modèle de force et de courage.*



# REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord je tiens à remercier **Corinne Vacher, Pascal Bonnarme, Hervé Sanguin** et **Florence Val** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mes travaux. Je vous souhaite à tous une bonne lecture !

Merci au **métaprogramme MEM** (INRAE) et à la **région Bretagne** d'avoir financé le projet Rhizoseed pendant ces trois années de thèse.

Merci à l'ensemble de l'unité IGEPP et à sa directrice **Maria Manzanares-Dauleux** de m'avoir accueillie pour effectuer ma thèse au sein de l'institut.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, **Christine Baysse, Stéphane Uroz** et **Alexandre Jousset**, pour leur enthousiasme sur le projet et leurs conseils qui m'ont permis de me poser les bonnes questions pour mener à bien cette thèse.

La thèse est une sacrée aventure qui forge notre caractère, transforme notre rapport à la science, à la vie, et au cours de laquelle de nombreuses émotions s'entremêlent.

*Engagement.* La thèse, ce sont d'abord des scientifiques qui croient en leur projet et qui le partagent avec une nouvelle recrue en qui ils placent leur confiance pour le mener à bien. **Alain, Matthieu**, je vous remercie de m'avoir donné cette opportunité, vous avez été des directeurs de thèse présents du premier jusqu'au dernier jour. Merci de vous être engagés auprès de moi, autant que je me suis engagée auprès de vous. **Alain**, merci pour ta disponibilité et ton aide même dans les tâches les plus ingrates, tu m'as appris à prendre du recul sur mes résultats et à ne pas jeter l'éponge trop vite quand ils étaient à première vue décevants. **Matthieu**, d'abord maître de stage en M1 tu n'avais pas fini d'entendre parler de moi ! Merci pour ta bienveillance et ton efficacité tant dans les corrections que dans les innombrables scripts que je te demandais. Tu as toujours fait preuve de patience même quand tu m'expliquais pour la 100<sup>e</sup> fois la même chose, et je t'en suis reconnaissante.

Tout au long de ces trois années de thèse, j'ai eu la chance d'avoir été entourée par une équipe, que dis-je, une famille formidable avec qui j'ai passé d'excellents moments (pauses café, Beer-Zone, Xtrem-Mud, Chic & Pop, les Gipsy Kings...) et qui m'a soutenue



en toutes circonstances ! Merci à tous mes collègues, et pas que microbiote : **Anne-Yvonne, Magali, Stéphanie, Kévin, Juliette, Lionel, Bruno, Stéphane, Christophe L., Susette, Claudia** et **Christophe M.**

*Complicité.* **Anne-Yvonne**, mamie, qu'aurais-je fait sans toi, qui as si souvent tort d'avoir raison ? Si tuer des plantes était un crime, tu auras été ma plus fidèle complice de meurtre. Grace à moi, tu auras passé ta première nuit au labo, à regarder germer des graines... qui ne germaient pas... quelle expérience incroyable !! Dans ces moments-là, merci de ne t'être jamais plainte que mes manips étaient pourries !

*Motivation.* **Bruno**, merci d'avoir accepté de remplacer mamie pendant qu'elle se la coulait douce à la Réunion, heu non ! chez elle en fait... Tu m'as été d'une grande aide sur mes dernières manips, et tu as toujours su me remotiver par ton enthousiasme. Je garde en mémoire la vitesse à laquelle tu trouves un trèfle à 4 feuilles au milieu des brins d'herbe !! Et un jour, j'espère savoir m'occuper des plantes aussi bien que tu le fais.

*Sollicitude.* **Kévin**, j'ai eu beaucoup de plaisir à te côtoyer pendant ces 3 années. Toujours dispo quand j'en avais besoin pour des petites questions R, je te remercie pour ton écoute et ta patience. J'en profite pour passer une commande de Trianon pour mon pot de thèse, il était vraiment trop bon !!!

*Passion.* Merci à **Stéphanie** et **Magali** pour notre passion commune : le shopping. Sans vous, j'aurais pu sombrer dans le mauvais goût, mais heureusement, vos conseils avisés m'ont permis de rester à la pointe de la mode ! Nos petites virées à Chic & Pop vont me manquer. **Magali**, qualifiée à de nombreuses reprises de mère spirituelle, merci pour tes blagues, toutes plus softs les unes que les autres... !! **Stéphanie**, je suis sûre que la pipelette que je suis va beaucoup te manquer... ! Je n'oublie pas la meilleure tarte citron meringuée du monde, celle de ta maman ! Je ne partirai pas d'ici sans avoir la recette !!!

*Gourmandise.* Serait-ce une qualité ? Non, plutôt un vilain défaut ! Evidemment derrière ce terme je ne peux que parler de toi, **Lionel**. Toujours partant (avec **Bruno** bien sûr) pour une part de gâteau, ou un (ou 2) bonbon même après un repas plus que copieux à la cantine ! J'espère que Bruno et toi vous aurez une petite pensée pour moi quand ils serviront du Tiramisu à la cantine. Je te remercie pour ton soutien, tes conseils, et tes incalculables « ça va le faire ! », sans oublier toutes les bêtises que tu peux raconter !





*Entraide.* **Juliette**, je te remercie pour ton aide, même à distance. Il y en a qui comparent leurs voitures, leurs muscles, nous on comparait nos kits d'extraction, c'est quand même bien plus intéressant !!

*Distraction.* **Stéphane** et **Christophe L.**, les repas à la cantine n'auraient pas été les mêmes sans vous. Merci à tous les deux pour votre bonne humeur quotidienne ! **Stéphane**, à quand le prochain shooting photo avec l'équipe ?

*Attachement.* **Morgane**, **Camille** ça y est ! C'est à mon tour de vous remercier pour tout !! J'ai gagné deux amies formidables, fidèles, attachantes, toujours prêtes à m'aider ou à me remonter le moral. Merci d'avoir été deux super colloqs de bureau, il est devenu bien vide quand vous êtes parties chacune votre tour... **Morgane**, tu as été ma sauveuse dans bien des situations, désolée pour tout le temps que je t'ai fait perdre à m'aider sur R, je ne te remercierai jamais assez pour tout ça, mais je pense qu'avec des sushis et quelques bières, ça peut s'arranger !! **Camille**, notre passion pour les bagues et les fleurs nous ont rapprochées, je regrette que le confinement ait écourté notre collocation. Merci pour ta gentillesse et ta gaieté quotidienne, sans oublier ta super imitation du lapin... !

*Camaraderie.* **Romain**, **Grégoire**, on a embarqué en même temps dans cette folle aventure et je la quitte en premier. Je nous vois encore hier « au fond de la classe » lors de nos premières formations, ou lorsque nous organisions ensemble la journée des doctorants. **Romain**, merci d'être passé me voir quasiment tous les jours pour faire une petite pause et m'écouter me plaindre presque autant que je t'écoutais te plaindre en retour. **Grégoire**, tu as encore un peu de temps devant toi, mais courage ça finira bien par se terminer un jour !! J'en profite pour remercier tous les doctorants **Rafaela**, **Estelle**, **Cécile**, **Agathe** et **Corentin** avec qui j'ai passé de bons moments, tant en soirées que lors de l'organisation de la 11<sup>e</sup> journée des doctorants SPE, c'était un super évènement !

*Bienveillance.* Je remercie chaleureusement toute l'équipe **Emersys** pour son accueil toujours agréable et bienveillant. Merci notamment à **Coralie**, ma super co-pilote de séquençage et reine de la culturomique. Malgré mes nombreuses tentatives pour te dépasser en vitesse de purification, tu restes la meilleure ! **Marie**, je tiens à te remercier sincèrement pour ton enthousiasme, ton implication et tes idées toujours plus nombreuses qui m'ont vraiment redonné du peps pour affronter les derniers mois de ma thèse. Merci à la team des doctorants d'Angers, **Justine**, **Enora**, **Caroline** et **Guillaume**, qui



m'ont toujours fait me sentir à ma place lors de mes venues ponctuelles. Une mention spéciale pour **Justine**, d'abord voisine de bureau en stage de M1 puis coloc de chambre à Aussois, j'ai trouvé en toi une amie. Je resterai éternellement jalouse de la longueur que peuvent atteindre tes cheveux !!! J'en profite pour passer une commande d'aquarelle, sérieusement, ce que tu fais est magnifique !

*Reconnaissance.* Merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, tant techniquement qu'administrativement. Je risque fort d'en oublier quelques-uns, et je m'en excuse. Merci à mes deux stagiaires **Valentine** (L3) et **Lila** (DUT). Merci à **Martial, Anne L., Ronan, Karima, Marie, Samir, Jocelyne, Angélique Q-L., Anne-Sophie, Frédéric Brunet, Régis, Sophie, Géraldine, Pascale, Olivier Preis**, et l'équipe des **serristes**. Je crois qu'il s'impose également d'exprimer ma gratitude à celui qui aura été mon plus fidèle compagnon tout au long de cette thèse. A toi, mon **ordinateur**. Malgré quelques petites frayeurs, tu as tenu bon jusqu'au bout, même quand je t'en demandais un peu trop.

*Pression.* Parce qu'il y a celle qu'on subit, mais surtout celle qu'on boit ! Je remercie les **amis Rennais** pour m'avoir permis de garder une vie sociale et de m'améliorer (ou peut-être pas...) au palet breton. Un grand merci à l'équipe du **BB & Cie**, qui vient de fêter ses 3 bougies, comme ma thèse... coïncidence ?

*Evasion.* Qui de mieux que des amis pour réussir à se détendre et à s'évader le temps d'une soirée, d'un week-end ? Pour cela je remercie d'abord mes fidèles amies **Manon** et **Axelle**, de m'avoir toujours écoutée et encouragée tout en me faisant rire à chaque instant passé ensemble. Merci à toute la Team, **Marlène, Charline, Laura, Sophie** et **Julie** pour avoir égayé mes journées avec toutes sortes de bêtises partagées entre nous, vous me fatiguez !! Mais ça y est, je reviens bientôt sur la même planète que vous !

*Soutien.* Parce que la fac favorise des rencontres incroyables, merci à mes chers amis de promo, j'ai nommé la très select Team Pot'1 : **Mélanie, Alexis P., Alexis L., Antoine, Renaud** et **Florian**. Certains d'entre vous m'ont suivie dans la même barque (ou serait-ce une galère ?), d'autres ont eu le bon sens de fuir... Merci d'avoir toujours fait de nos retrouvailles des moments de franche rigolade. **Mélanie**, maintenant que pour toi aussi, (mais oui, mais oui) la thèse est finie, il faut que tu te remettes à la pâtisserie !!!



*Fierté.* Je remercie de tout cœur mon **Papa**, ma **Maman**, mon frère **Jean-Eudes**, et mes sœurs **Gaby**, **Cécile** et **Clémence** pour la fierté lue dans leurs yeux. Malgré mes plaintes presque quotidiennes, votre soutien indéfectible m'a permis d'aller jusqu'au bout. Fierté, oui mais également *Bonheur*, et pour cela je remercie **Alix**, le plus beau des petits neveux, et ses parents, **Gaby & Dorian**, pour leurs nombreuses vidéos qui ont attendri mes fins de journées pendant toute cette dernière année.

*Persévérance.* Car tu ne m'as jamais lâchée, ni avant, ni après ton départ, c'est à toi que je dois de n'avoir jamais baissé les bras. Merci ma **Cécile**.

*Dévouement.* Qu'il est difficile de trouver des mots à la hauteur de toute la gratitude que je veux te témoigner. Merci mon amour, **mon Moineau**. Merci d'avoir absolument tout fait dans l'appartement pendant des mois et des mois, alors que toi aussi, tu préparais ta thèse... c'est promis je vais me rattraper ! Merci pour l'incroyable patience dont tu as fait preuve quand j'en manquais, merci de m'avoir toujours soutenue, encouragée et persuadée que je méritais d'en être arrivée jusque-là. Et enfin, merci de ne pas trouver ces remerciements « ringards ».

*Maintenant, en route vers de nouvelles aventures !*



# TABLE DES MATIERES

---

Remerciements .....	ii
Table des matières.....	vii
Liste des figures .....	xi
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations .....	xvi
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>La plante dans un contexte phytobiome.....</b>	<b>2</b>
<b>A. Les communautés microbiennes associées aux plantes.....</b>	<b>3</b>
1. La plante et son microbiote.....	3
a. Sémantique du microbiote.....	3
b. Etude du microbiote.....	4
i. Métabarcoding et marqueurs moléculaires.....	4
ii. Séquençage et outils d'analyse .....	6
iii. Analyse de la diversité microbienne .....	8
iv. Culturomique.....	9
v. Autres outils d'analyse du microbiote.....	10
c. Gamme d'interaction entre l'hôte et son microbiote .....	11
i. Symbiose.....	11
ii. Dysbiose.....	12
2. Les spécificités d'habitats de la plante.....	14
a. Endophytes et épiphytes .....	14
b. Graine et spermosphère.....	15
c. Rhizosphère et phyllosphère .....	16
3. Transmission et assemblage des communautés microbiennes .....	18
a. Transmission du microbiote et concept de l'holobionte .....	18
i. Transmission horizontale.....	18
ii. Transmission verticale .....	19
iii. L'holobionte.....	20
b. Processus écologiques impliqués dans l'assemblage .....	20
i. La sélection .....	21
ii. La dispersion.....	22
iii. La diversification.....	22
iv. La dérive écologique.....	23
v. Les effets de priorité .....	24
c. La coalescence des communautés .....	25
4. Facteurs influençant la structure du microbiote des plantes.....	27
a. Les facteurs environnementaux .....	27
i. Les facteurs édaphiques.....	27
ii. Les contraintes climatiques et la localisation géographique .....	27
b. Les facteurs anthropologiques.....	28
c. Les facteurs « plante » .....	29
i. Facteurs génétiques et phylosymbiose.....	29
ii. Le stade de développement .....	30





<b>B. La graine</b> .....	<b>32</b>
1. Les plantes à graines .....	32
2. Formation et morphologie de la graine chez les Brassicacées .....	32
a. La pollinisation .....	32
b. Fécondation et formation de la graine.....	33
3. Le microbiote de la graine .....	34
a. Méthodologie.....	34
b. Assemblage et transmission du microbiote de la graine.....	35
i. Transmission par voie interne .....	36
ii. Transmission par voie florale .....	37
iii. Transmission par voie externe.....	38
c. Diversité, composition et variation du microbiote de la graine.....	38
i. Richesse et diversité du microbiote .....	38
ii. Facteurs influençant le microbiote de la graine.....	40
4. Transmission, évolution et rôle du microbiote de la graine.....	41
a. Germination et rôle du microbiote.....	41
b. Evolution du microbiote au cours de la germination et la levée.....	43
c. Le microbiote de la graine à travers les générations.....	44
<b>C. Le colza</b> .....	<b>45</b>
1. Intérêt agronomique et économique.....	45
2. Taxonomie et génétique .....	46
3. Le cycle de développement du colza d'hiver.....	46
4. Les maladies associées au colza d'hiver.....	47
a. Le rhizoctone brun.....	47
i. Morphologie et classification .....	47
ii. <i>Rhizoctonia solani</i> AG2-1.....	49
b. Méthodes de lutte contre les maladies .....	49
<b>D. Objectifs de thèse</b> .....	<b>51</b>
<b>CHAPITRE I INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT ET DU GENOTYPE DE L'HOTE SUR LA STRUCTURE ET LA DIVERSITE DU MICROBIOTE DES GRAINES DE COLZA</b> .....	<b>53</b>
Présentation du chapitre.....	54
Introduction .....	55
Materials and methods .....	56
Selection of WOSR genotypes.....	56
Seed production.....	56
Seed phenotyping.....	56
Microbial DNA sample preparation .....	56
Libraries construction and sequencing.....	57
Sequence processing.....	57
Microbial community analyses.....	57
Results.....	57
Diversity of the seed microbiota of <i>B. napus</i> .....	57
Core and specific fractions of the <i>B. napus</i> microbiota.....	57



Relationship between <i>B. napus</i> genotypes and seed microbiota composition.....	59
Impact of production year and host genotype on seed phenotypes .....	59
Discussion .....	59
Supplemental data.....	66
<b>CHAPITRE II COALESCENCE ASYMETRIQUE ENTRE LE MICROBIOTE DES GRAINES ET LE MICROBIOTE DU SOL AU COURS DES PREMIERS STADES DE DEVELOPPEMENT DE LA PLANTE.....</b>	<b>78</b>
Présentation du chapitre.....	79
Introduction .....	81
Materials and Methods.....	83
Soil preparation.....	83
Sowing and sampling.....	83
Microbial DNA sample preparation .....	84
Library construction and sequencing .....	84
Sequence processing.....	85
Microbial community analyses.....	85
Transmission analyses.....	86
Results.....	87
Selected seed lots have distinct microbial communities .....	87
Production of soils with contrasting levels of diversity .....	87
Initial level of soil diversity impacted the diversity and structure of the plant microbiota... 88	
Relative contribution of seed-borne and soil taxa to seedling microbiota.....	89
Seedling transmission success of seed-borne and soil microbiota.....	90
Emergence of rare and sub-dominant taxa in seedlings.....	91
Discussion .....	93
Asymmetric outcome of seed and soil community coalescence in favor of soil microbiota.. 93	
Seedling microbiota assembly is driven by the level of soil diversity but not the structure of the seed microbiota .....	94
Seedling microbiota is primarily composed of initially rare and sub-dominant taxa in source communities.....	95
Conclusion.....	96
Supplemental data.....	97
<b>CHAPITRE III INFLUENCE DU MICROBIOTE DES GRAINES ET DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DU SOL SUR LA REPONSE DE GENOTYPES DE COLZA A <i>RHIZOCTONIA SOLANI</i>.....</b>	<b>104</b>
Introduction .....	105
Matériel et Méthode .....	107
Préparation des sols.....	107
Préparation de l'inoculum .....	107
Sélection des génotypes.....	107
Semis et inoculation .....	108
Observation et prélèvements.....	109
Extraction d'ADN, construction des bibliothèques d'amplicons, séquençage et traitement.....	109
Analyse phénotypique.....	110
Séquençage de la portion ITS1-ITS4 de la souche R5 .....	110
Quantification du champignon pathogène.....	110



Analyse des communautés microbiennes .....	111
Résultats et Discussion .....	112
Rappel sur la diversité du microbiote des pools de départ .....	112
Analyse phénotypique et quantification du pathogène à d14 .....	112
Effet de la maladie sur la diversité et la composition des assemblages microbiens .....	115
Effet de <i>R. solani</i> sur l'abondance relative de taxons spécifiques .....	117
Conclusion.....	120
Données supplémentaires .....	121
<b>CHAPITRE IV TRANSMISSION DE COMMUNAUTES SYNTHETIQUES DE LA GRAINE A LA PLANTULE ET IMPACT SUR LE PARASITISME TELLURIQUE .....</b>	<b>124</b>
Introduction .....	125
Matériel et méthodes.....	127
Collection de communautés bactériennes associées aux semences .....	127
Constitution des communautés synthétiques (SynCom) .....	128
Tests d'antagonisme des souches bactériennes vis-à-vis de <i>R. solani</i> R5.....	129
Préparation des graines.....	129
Préparation du sol.....	130
Préparation de l'inoculum, inoculation et semis.....	130
Prélèvements et conservation des échantillons .....	130
Construction des bibliothèques d'amplicons, séquençage et traitement.....	131
Analyse des communautés microbiennes .....	132
Analyse phénotypique.....	133
Résultats.....	134
Collection d'isolats bactériens .....	134
Antagonisme des souches bactériennes vis-à-vis de <i>R. solani</i> .....	134
Suivi des souches inoculées lors de la germination-levée.....	135
Effet des communautés synthétiques sur la richesse et la diversité microbienne .....	136
Impact du traitement initial SynCom sur les taxons microbiens.....	138
Effet des communautés synthétiques sur la maladie causée par <i>R. solani</i> .....	139
Conclusion et perspectives.....	141
<b>DISCUSSION-PERSPECTIVES.....</b>	<b>143</b>
<b>Discussion générale.....</b>	<b>144</b>
Objectifs et résultats principaux.....	144
Influence du génotype de l'hôte sur la structuration du microbiote .....	145
Transmission du microbiote des graines .....	147
Etude du microbiote : limites et perspectives.....	150
L'utilisation de communautés synthétiques : une approche prometteuse pour palier à la variabilité du microbiote des graines .....	153
<b>Perspectives .....</b>	<b>155</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>160</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>161</b>



# LISTE DES FIGURES

---

## INTRODUCTION GENERALE

---

Figure 1 : Le phytobiome.

Figure 2 : Régions génomiques des différents marqueurs moléculaires étudiés.

Figure 3 : Schéma synoptique des principales étapes en métabarcoding et culturomique à partir de l'échantillonnage jusqu'au séquençage.

Figure 4 : Représentation schématique des différents niveaux de diversité. L' $\alpha$ -diversité représente la diversité intra-échantillon.

Figure 5 : Nature des interactions biotiques entre individus.

Figure 6: Différentes réponses d'un microbiote à une perturbation de son environnement.

Figure 7 : Les différents habitats de la plante.

Figure 8 : Nombre de publications traitant du microbiote des plantes selon l'habitat depuis les années 2000.

Figure 9 : Modes de transmission du microbiote des plantes.

Figure 10 : Représentation de l'holobionte.

Figure 11 : Processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des plantes.

Figure 12 : Différents types d'évènements de coalescence.

Figure 13 : Facteurs influençant la structure du microbiote des plantes.

Figure 14 : Organisation des Spermatophytes et importance des Angiospermes dans le règne végétal.

Figure 15 : Morphologie schématique de la fleur chez les Angiospermes.

Figure 16 : Développement de la graine chez *Arabidopsis thaliana* (Brassicacée).

Figure 17 : Les différents types de graines.

Figure 18 : Culture du colza en France et dans le monde.

Figure 19 : Cycle de développement du colza d'hiver au cours des saisons.

Figure 20 : Morphologie et particularités du champignon *Rhizoctonia solani*.

Figure 21 : Phylogénie des groupes et sous-groupes d'anastomose de *Rhizoctonia solani*.

Figure 22 : Exemples de symptômes provoqués par le champignon phytopathogène *R. solani* sur plantules de colza.





## **CHAPITRE I : Influence de l'environnement et du génotype de l'hôte sur la structure et la diversité du microbiote des graines de colza**

---

Figure 1: Diversity of seed-associated microbial assemblages of *B. napus*.

Figure 2: Similarities in microbial composition between *B. napus* genotypes seed-associated microbial assemblages.

Figure 3: Taxonomic composition of *B. napus* seed microbiota.

Figure 4: Generalist and specific bacterial ASVs.

Figure 5: Generalist and specific fungal ASVs.

Figure 6: Dynamics of seed germination of each genotype and year.

## **CHAPITRE II : Coalescence asymétrique entre le microbiote des graines et le microbiote du sol au cours des premiers stades de développement de la plante**

---

Figure 1: Diversity of initial seed and soil microbial community pools before coalescence.

Figure 2: Structuration of seedling microbiota after coalescence with contrasted seed and soil microbiota.

Figure 3: Origin of microbial taxa within stem and root communities.

Figure 4: Taxonomic profiles of microbial communities associated to *Brassica napus*.

Figure 5: Influence of the initial bacterial and fungal diversity of the colonizing pools (seed or soil) on the transmission success to the seedling.

Figure 6: Relationship between relative abundance of transmitted bacterial and fungal ASVs in the source (seed or soil) and in seedling roots and stems.

## **CHAPITRE III : Influence du microbiote des graines et de la diversité microbienne du sol sur la réponse de génotypes de colza à *Rhizoctonia solani***

---

Figure 1 : Classes de symptômes provoqués par l'isolat *R. solani* R5 sur colza.

Figure 2 : Dispositif expérimental d'inoculation de *R. solani* R5 et semis de graines de colza.

Figure 3 : Distribution de la fréquence des symptômes provoqués par inoculation de l'isolat *R. solani* R5 selon le lot de graines de *B. napus* initial (génotype/année) et la diversité de sol.

Figure 4 : Relation entre la quantification du pathogène par qPCR et l'abondance relative de l'ASV correspondant, dans les racines et les tiges de chaque génotype et année, selon la diversité de sol.

Figure 5 : Effet de l'inoculation sur la richesse et la diversité microbienne des plantules du sol High.

Figure 6 : Effet de l'inoculation sur la structure des assemblages bactériens et fongiques dans les racines et les tiges du sol High.



Figure 7 : Taxons bactériens répondant positivement ou négativement selon un gradient de concentration de champignon pathogène.

Figure 8 : Organisation des taxons positivement ou négativement impactés par la présence du champignon pathogène parmi la diversité phylogénétique bactérienne des plantules inoculées à d14.

#### **CHAPITRE IV : Transmission de communautés synthétiques de la graine à la plantule et impact sur le parasitisme tellurique**

---

Figure 1 : Dispositif de confrontation des souches bactériennes et du mycélium de *R. solani*.

Figure 2 : Plan d'échantillonnage des différents compartiments à chaque stade de développement de la plante et pour chaque traitement SynCom.

Figure 3 : Collection cultivable de communautés bactériennes associées aux graines de *B. napus* identifiées avec 16S et *gyrB*.

Figure 4 : Confrontation des six souches bactériennes vis-à-vis du champignon *R. solani* R5.

Figure 5 : Identification et abondance des ASV des souches des communautés synthétiques dans les différents compartiments de la plante au cours du temps.

Figure 6 : Influence du traitement des graines sur la richesse bactérienne et fongique des graines et plantules au cours du temps.

Figure 7 : Cinétique de l'influence du traitement des graines sur la structure du microbiote des graines et plantules.

Figure 8 : Abondance relative des ASV bactériens impactés par le traitement initial des graines.

Figure 9 : Comparaison du pourcentage de plantes levées dans les témoins et les plantes inoculées au stade d14 en fonction du traitement SynCom des graines.

Figure 10 : Influence du traitement des graines sur la maladie provoquée par le champignon pathogène *R. solani* R5.

#### **DISCUSSION – PERSPECTIVES**

---

Figure 1 : Bilan des principales conclusions supportées par les différents chapitres de ce manuscrit de thèse.

Figure 2 : Immunité étendue de l'hôte médiée par le microbiote.

Figure 3 : Utilisation de communautés synthétiques, avantages pour identifier des leviers de pilotage du microbiote des plantes.

Figure 4 : Stratégie expérimentale proposée pour étudier l'effet du génotype de l'hôte sur le maintien de SynCom.

Figure 5 : Stratégie expérimentale proposée pour étudier l'effet du microbiote des graines sur leur cinétique de germination par l'usage de SynCom.



# LISTE DES TABLEAUX

---

## INTRODUCTION GENERALE

---

Tableau 1 : Mode de fécondation chez quelques plantes cultivées.

Tableau 2 : Rôle bénéfique des microorganismes associés au colza dans sa santé et sa croissance.

## CHAPITRE I : Influence de l'environnement et du génotype de l'hôte sur la structure et la diversité du microbiote des graines de colza

---

Table 1: Percentage of explained variance for  $\beta$ -diversity estimators.

Table 2: Core members of *Brassica napus* seed microbiota.

## CHAPITRE II : Coalescence asymétrique entre le microbiote des graines et le microbiote du sol au cours des premiers stades de développement de la plante

---

Table 1: Soil physicochemical analyses and relative abundance of bacterial nitrifiers.

Table 2: Permutational multivariate analysis of variance on seedling roots and stems microbial beta-diversity.

## CHAPITRE III : Influence du microbiote des graines et de la diversité microbienne du sol sur la réponse de génotypes de colza à *Rhizoctonia solani*

---

Tableau 1 : Analyse de variance effectuée sur l' $\alpha$ -diversité microbienne des plantules du sol High.

Tableau 2 : Analyse de variance multivariée permutationale sur les indices de  $\beta$ -diversité microbienne des plantules du sol High.

Tableau 3 : Origine potentielle des ASV bactériens positivement et négativement impactés par la présence du pathogène.

## CHAPITRE IV : Transmission de communautés synthétiques de la graine à la plantule et impact sur le parasitisme tellurique

---

Tableau 1 : Souches bactériennes sélectionnées parmi la collection de culture pour la constitution des communautés synthétiques sc1 et sc2.

Tableau 2 : Analyse de variance effectuée sur la richesse microbienne estimée avec Chao1.



Tableau 3 : Analyse de variance multivariée permutacionnelle (PERMANOVA) sur les indices de  $\beta$ -diversité microbienne.

Tableau 4 : Analyse de variance multivariée permutacionnelle entre communautés bactériennes en fonction du stade de développement.

Tableau 5 : Nombre d'ASV dont l'abondance relative est modifiée en fonction du traitement initial des graines.

Tableau 6 : ASV bactériens et fongiques dont l'abondance relative est enrichie (+) ou diminuée (-) suite à l'inoculation de *R. solani* dans le sol.

## **DISCUSSION – PERSPECTIVES**

---

Tableau 1 : Vue d'ensemble de questions de recherches et approches utilisées dans l'étude des taxons rares (Jousset *et al.*, 2017).

Tableau 2 : Exemples d'utilisation des communautés synthétiques et réponse obtenue (Compant *et al.*, 2019).





# LISTE DES ABREVIATIONS

---

## - A -

(PERM)ANOVA : (PERmutational  
Multivariate) ANalysis Of VAriance

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AG : Groupe d'Anastomose

AOB : Bactéries Oxydant l'Ammoniac

ARNr : Acide RiboNucléique  
ribosomique

ASV : Amplicon Sequence Variant

## - C -

CLM : Cumulative Linked Model

## - D -

DADA2 : Divise Amplicon Denoising  
Algorithm 2

DAPI : 4', 6-DiAmidino-2-Phényl-Indole

DO : Densité Optique

## - F -

FISH : Fluorescence In Situ  
Hybridization

## - I -

ISTA : International Seed Testing  
Association

iTOL : interactive Tree Of Life

ITS : Internal Transcribed Spacer

## - L -

LPGA : Levure Peptone Glucose Agar

## - N -

NCBI : National Center for  
Biotechnology Information

NOB : Bactéries Oxydant les Nitrites

## - O -

OTU : Operational Taxonomic Unit

## - P -

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCoA : Principal Coordinates Analysis

PCR : Polymerase Chain reaction

PGPR : Plant Growth Promoting  
Rhizobacteria

PICRUST : Phylogenetic Investigation of  
Communities by Reconstruction of  
Unobserved States

PMG : Poids pour Mille Grains

## - R -

RDP : Ribosomal Data Project

## - S -

SD : Standard Deviation

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

## - T -

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

## - U -

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra-Violets

## - V -

VBNC : Viables Non-Cultivables



# INTRODUCTION GENERALE

---



**Figure 1 : Le phytobiome.** Ensemble des réseaux d'interactions entre la plante (au centre) et tous les facteurs biotiques (micro- et macro-organismes) et abiotiques (climat, sol, nutriments) qui participent à sa santé et sa croissance. Tous ces facteurs sont inter-connectés. Figure inspirée de la feuille de route Phytobiomes (Phytobiomes roadmap)

## LA PLANTE DANS UN CONTEXTE PHYTOBIOME

Depuis des dizaines d'années, les biologistes étudient la plante et ses interactions avec son environnement biotique et abiotique. Et c'est au cours de leurs observations que les chercheurs en écologie ont mesuré petit à petit la complexité et l'étendue de ces interactions essentielles à la survie de la plante. Il est alors devenu indispensable de ne plus considérer la plante comme un organisme isolé, mais comme une partie d'un ensemble complexe.

Tout au long de son cycle de croissance, la plante interagit ainsi plus ou moins intimement avec de nombreux partenaires qui jouent un rôle bénéfique ou néfaste dans sa santé et sa croissance. Certains sont visibles comme les insectes ou les nématodes, d'autres invisibles comme les bactéries et les champignons microscopiques, et leurs interactions entre eux et avec la plante sont soumises à de nombreuses contraintes environnementales telles que le climat, la nature du sol, la disponibilité en nutriments ou encore les pratiques culturales. C'est au regard de tous ces éléments qu'a été introduit, par la phytopathologiste américaine Jan Leach en 2013, le terme « phytobiome » qui vient du grec *phytón* (« plante », « végétal ») et *bios* (« vie »). Ce concept récent se place à l'échelle de l'écosystème (le biome) et tend à regrouper dans sa globalité la plante, tous les organismes vivants macro- et microscopiques qui lui sont associés et avec lesquels elle interagit mais également l'environnement abiotique qui l'entoure (**Fig. 1**). Dans sa définition large, le phytobiome est donc l'ensemble des réseaux d'interactions complexes entre la plante et tous les facteurs biotiques et abiotiques qui influencent sa santé et sa croissance (Leach *et al.*, 2017).

En écologie des communautés, si la plante est placée dans un contexte phytobiome, c'est qu'avec les outils technologiques et bio-informatiques en perpétuel développement, des études à cette échelle sont aujourd'hui possibles. Pour faciliter la recherche à l'échelle du phytobiome, une alliance regroupant de nombreux acteurs académiques et industriels a été créée (*i.e.* Phytobiomes Alliance) (Phytobiomes roadmap, 2016; Beans, 2017). Certains scientifiques s'intéressant principalement aux interactions plante-microorganismes utilisent également le terme phytobiome dans une définition plus restreinte, englobant seulement la plante et son cortège de microorganismes associé (Baltrus, 2017). Au cours de cette thèse, je me suis précisément intéressée au phytobiome dans une définition englobant la plante, le sol et leurs microorganismes associés.



## A. LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES ASSOCIÉES AUX PLANTES

### 1. LA PLANTE ET SON MICROBIOTE

#### a. Sémantique du microbiote

Comme mentionné précédemment, la plante est donc loin de mener une vie solitaire. En effet, à l'instar des autres organismes macroscopiques, et de tous les écosystèmes qui peuplent notre planète, la plante vit et interagit avec des centaines de milliers de microorganismes. Plusieurs termes sont utilisés pour nommer l'ensemble de ces microorganismes, il est donc important de faire un point à ce sujet.

L'ensemble des communautés microbiennes associées à un environnement donné est appelé « microbiote ». Ce terme générique employé depuis plus de 50 ans (Lackey, 1956), vient du grec *mikros* (« petit ») et *bios* (« vie »), il peut ainsi être utilisé pour décrire l'ensemble des microorganismes associés à tous les types d'habitats. Ainsi, il existe un microbiote spécifique associé à chaque organisme vivant de notre planète, et pour chaque individu, on peut distinguer différents microbiotes selon l'échelle à laquelle on se place. Par exemple chez l'Homme, on parle de « microbiote intestinal » pour décrire les communautés microbiennes associées au système digestif (Thursby & Juge, 2017). Il existe également un microbiote associé aux différents écosystèmes naturels, tels que le sol, les océans, et l'atmosphère, et même un microbiote spécifique à chaque aliment et chaque objet qui nous entoure (Gilbert *et al.*, 2014). Certains emploient également le terme « microbiome » pour décrire ces communautés microbiennes. Cependant l'étymologie de ce mot est ambiguë selon que l'on le décompose « micro-biome » ou « microbio-ome ». En effet, selon cette dernière décomposition, le microbiome tiendrait non seulement compte de l'ensemble des microorganismes, mais également de leur génome (*i.e.* métagénome) et donc du potentiel fonctionnel de la communauté (Whipps *et al.*, 1988; Prescott, 2017). Enfin, depuis peu, un autre terme spécifique à la plante est employé, le « phytomicrobiome » (Uroz *et al.*, 2019). Pour éviter d'éventuelles ambiguïtés à la lecture de ce manuscrit, j'emploierai donc systématiquement le terme « microbiote » comme synonyme des communautés microbiennes, et le terme « métagénome » pour décrire l'ensemble des génomes de ces communautés microbiennes (Handelsman *et al.*, 1998). Par ailleurs, au sens large, le microbiote des plantes inclut l'ensemble des organismes microscopiques qui lui sont associés, à savoir les bactéries, les champignons,





les virus, les archées et les protistes (Turner *et al.*, 2013). Etudier de manière exhaustive le microbiote en incluant l'ensemble de ces microorganismes est complexe et requière la combinaison de multiples marqueurs moléculaires ou bien un séquençage massif aléatoire pour chaque échantillon. Ici, je m'en tiens donc principalement aux communautés bactériennes et fongiques.

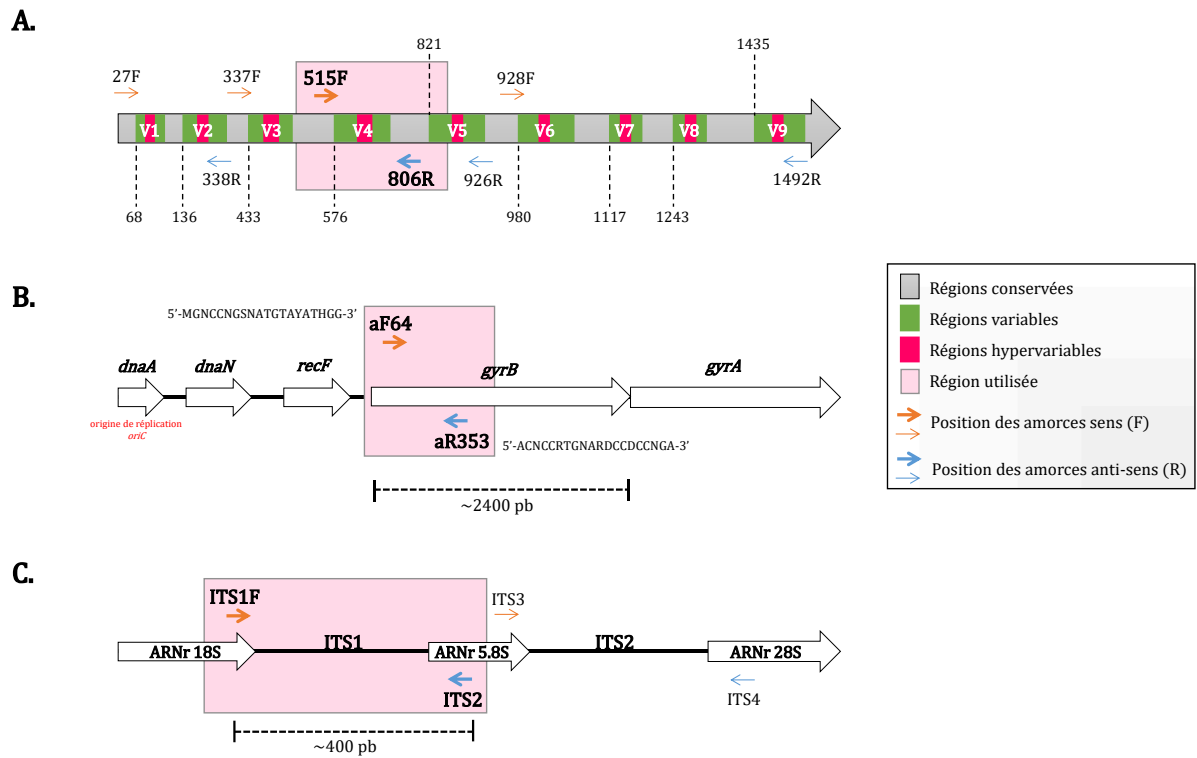
## **b. Etude du microbiote**

Initialement, la diversité du microbiote n'était appréhendée qu'à travers la culture de microorganismes. Cependant, la majorité des bactéries et des champignons d'un environnement donné ne sont pas ou très difficilement cultivables sur des milieux synthétiques définis et l'on sait pertinemment que par cette seule approche, la diversité du microbiote est fortement sous-estimée. Des outils technologiques adaptés ont donc été développés afin de pouvoir appréhender la richesse et la diversité du microbiote. C'est pourquoi ces 20 dernières années, des approches dites culture-indépendantes ont été développées afin de répondre à ces attentes et s'affranchir des limites du cultivable.

### *i. Métabarcoding et marqueurs moléculaires*

Les approches indépendantes des méthodes de culture se basent majoritairement sur le séquençage de fragments d'ADN. Plusieurs approches existent pour identifier les individus et estimer leur diversité. Par exemple, la métagénomique consiste en l'étude de l'ensemble des génomes du microbiote (*i.e.* métagénome) d'un environnement donné, par séquençage aléatoire massif. A l'inverse, le métabarcoding permet d'identifier les individus en se basant sur le séquençage d'une portion de leur génome pouvant les discriminer en tant qu'espèces (ou presque). Ces portions ciblées du génome sont couramment appelées marqueurs moléculaires ou code-barres.

Le métabarcoding repose donc sur la capacité de différencier des taxons bactériens ou fongiques selon la séquence nucléotidique d'une partie de leur génome. Chez les procaryotes, la classification phylogénétique des espèces repose sur la séquence nucléotidique du gène codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique (ARNr). Chez les eucaryotes c'est le gène codant la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique qui permet de retracer l'histoire évolutive des organismes (Woese & Fox, 1977). En effet, les ARN ribosomiques étant impliqués dans la synthèse protéique, ils sont universels et leur stabilité est essentielle à la survie et au maintien de la cellule et ils sont de ce fait très peu



**Figure 2 : Régions génomiques des différents marqueurs moléculaires étudiés.** (A) gène de l'ARNr 16S bactérien. (B) gène *gyrB* et autres gènes impliqués dans la réplication de l'ADN bactérien. (C) région des gènes ribosomique fongique et régions intergéniques ITS1 et ITS2. Pour chaque gène, les différentes amorces utilisées sont indiquées (amorce sens en orange et antisens en bleu). Les amorces en gras sont celles utilisées dans nos études et la séquence nucléotidique des amorces *gyrB* dégénérées a été détaillée.

sujets aux mutations et à la dérive génétique. Ainsi, les variations nucléotidiques observées sur ces gènes sont le fruit d'une évolution lente permettant de retracer l'histoire évolutive des espèces. L'avantage des ARN ribosomiques est que leur séquence nucléotidique contient des régions hypervariables (9 régions pour l'ARNr 16S et 18S) permettant de discriminer les taxons, et des régions nucléotidiques conservées dans lesquelles peuvent être désignées des amorces universelles (**Fig. 2A**). Ces gènes ont ainsi été les premiers à être séquencés et analysés afin d'identifier les différents taxons constituant les communautés microbiennes (Olsen *et al.*, 1986; Field *et al.*, 1988). Pendant des années, le recensement de plusieurs centaines de nouvelles espèces a été effectué sur la base de ces séquences d'ARNr, et des bases de données ribosomiques ont été créées et enrichies au fil du temps (Pruesse *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2014).

Encore aujourd'hui, la plupart des études utilisent le gène de l'ARNr 16S pour étudier les communautés bactériennes. Il existe cependant un certain nombre de biais expérimentaux liés à l'utilisation de ce marqueur moléculaire. En effet, ce gène est présent en plusieurs copies sur le génome ce qui provoque une surestimation de la richesse réelle d'un taxon, une cellule bactérienne pouvant être comptée autant de fois qu'il y a de copies de ce gène dans son génome. Par ailleurs, quelle que soit la région variable ciblée sur ce gène, aucune ne permet de discriminer les espèces bactériennes, la classification s'arrêtant donc dans la plupart des cas au genre. Par ailleurs, les amorces 16S peuvent également amplifier des séquences d'ADN chloroplastiques et mitochondriales ce qui pose problème lorsque l'on étudie le microbiote des plantes. Pour pallier ces inconvénients, de nouveaux marqueurs moléculaires ont été identifiés. Pour les procaryotes, on peut par exemple citer les gènes *gyrB* et *rpoB*. Le gène *gyrB* code la sous-unité  $\beta$  de la gyrase bactérienne qui est une topoisomérase impliquée dans la réplication de l'ADN. Les gènes codant la machinerie de réplication de l'ADN sont indispensables au maintien de l'organisme et sont donc situés proches de l'origine de réplication, où les séquences sont moins sujettes aux mutations (**Fig. 2B**). Le gène *gyrB* est donc retrouvé universellement chez toutes les espèces bactériennes (Huang, 1996). Au début des années 2000, *gyrB* a été utilisé dans plusieurs études et sur divers taxons bactériens (Yamamoto & Harayama, 1996; Fukushima *et al.*, 2002; La Duc *et al.*, 2004), et a ainsi été défini comme un marqueur phylogénétique plus résolutif que l'ADNr 16S pour discriminer les espèces bactériennes. Cependant, il existe également des biais avec ce marqueur. En effet, la séquence nucléotidique du gène *gyrB* contient très peu de régions conservées, les

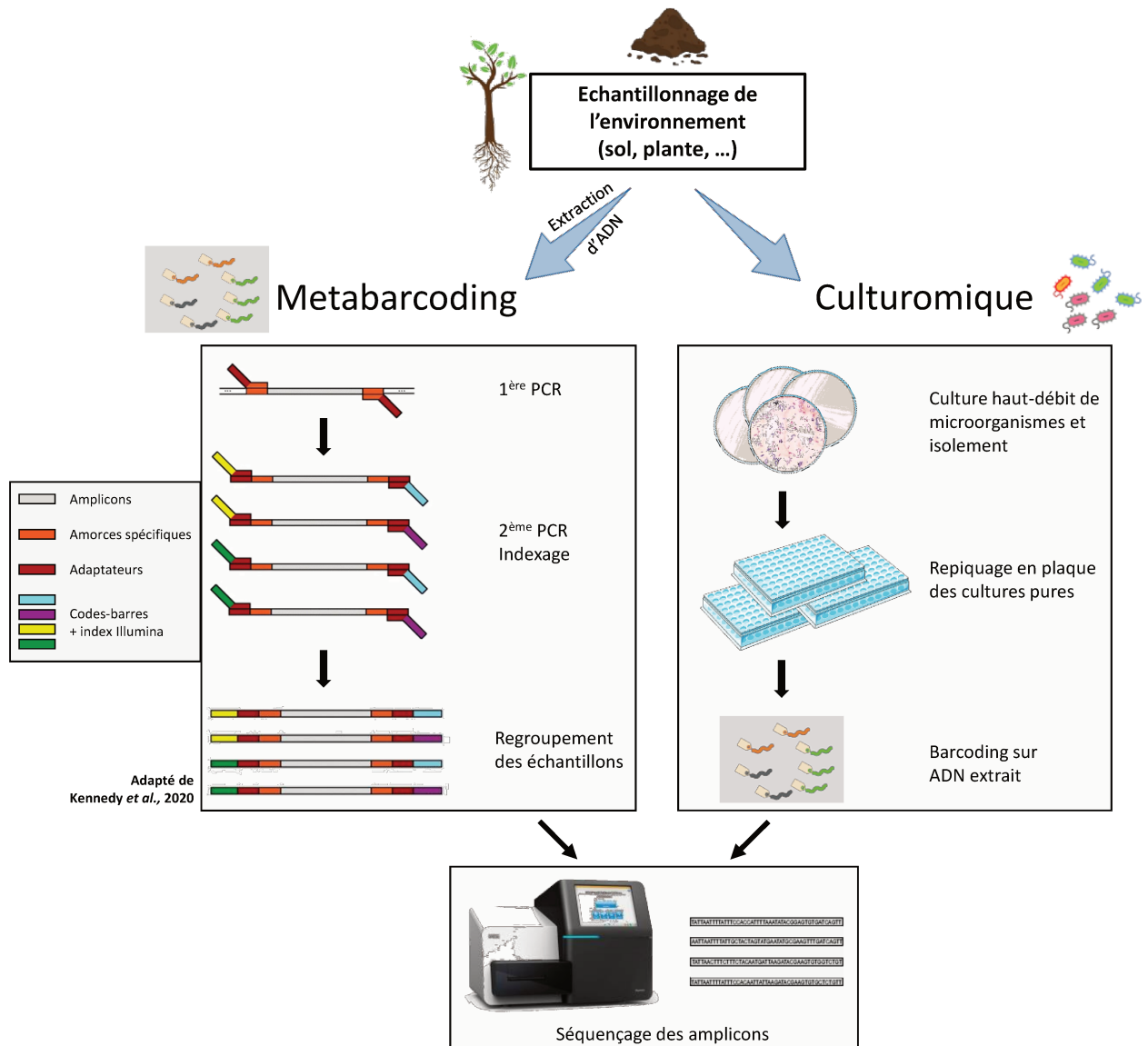


Figure 3 : Schéma synoptique des principales étapes en metabarcoding et culturomique à partir de l'échantillonnage jusqu'au séquençage. Adapté de Kennedy *et al.*, 2020.

amorces ciblant la portion d'intérêt de ce gène sont donc fortement dégénérées (**Fig. 2B**). Cette dégénérescence des amorces provoque un biais de l'abondance relative des taxons lors de l'amplification de l'ADN, du fait d'un épuisement plus rapide de chaque version d'amorces.

Chez les eucaryotes, et plus précisément chez les champignons, les deux principaux marqueurs utilisés sont le gène codant l'ARNr 18S et les régions intergéniques ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer). Ces régions sont situées entre les gènes codant la petite et la grande sous-unité des ARNr (**Fig. 2C**). De nombreux inconvénients ont été relevés concernant la définition d'un marqueur moléculaire universel qui conviendrait pour tous les champignons, notamment du fait de l'ambiguïté de leur classification phylogénétique, puisque les champignons sont issus de plusieurs lignées évolutives indépendantes (Selosse & Durrieu, 2004) et de la grande variabilité en terme de taille et de nombre de copies de leurs gènes. Pour l'heure, les régions ITS ont été définies comme le meilleur compromis pour discriminer les espèces fongiques d'un environnement donné, notamment du fait de son succès d'amplification et de séquençage (Schoch *et al.*, 2012).

En résumé, que ce soit pour les procaryotes comme les eucaryotes, il n'existe pas de marqueur moléculaire parfait.

## *ii. Séquençage et outils d'analyse*

Afin d'étudier le microbiote par métabarcoding, la première étape consiste à extraire l'ADN total à partir d'un échantillon, puis d'amplifier le marqueur moléculaire d'intérêt par PCR avec des amorces spécifiques. Les amplicons obtenus peuvent ensuite être séquencés. Cependant, plusieurs échantillons sont généralement étudiés en même temps, mais pour les séquencer simultanément, une étape consiste à tous les mélanger. Il faut donc un moyen pour les discriminer entre eux après séquençage. Dans ce cas, après amplification des marqueurs moléculaires, une seconde PCR est effectuée pour ajouter des code-barres (ou index, tags) de quelques paires de bases qui seront chacun spécifique d'un échantillon (**Fig. 3**).

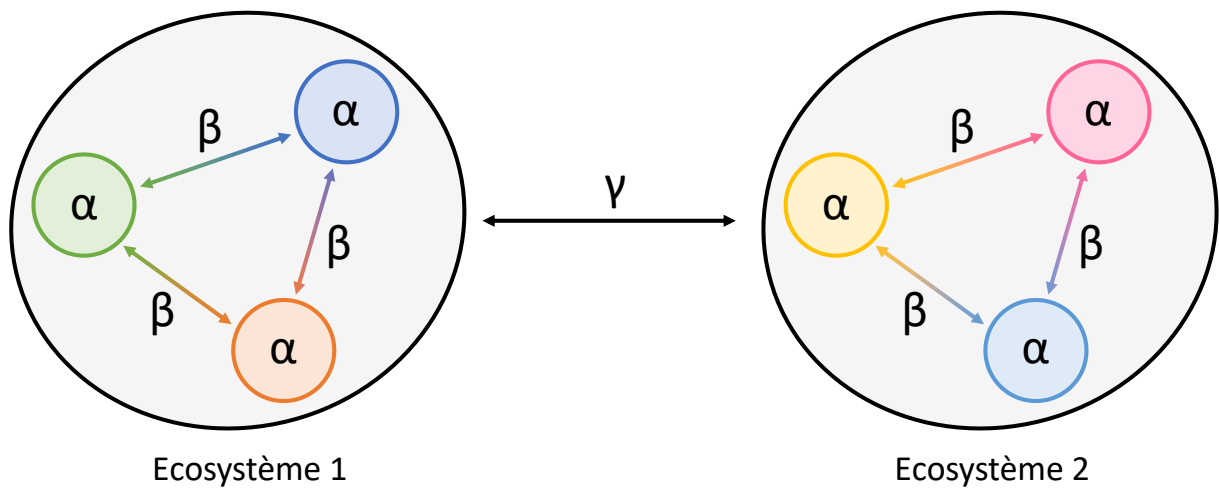
Le séquençage est l'étape clé dans l'étude des communautés microbiennes, puisque c'est à ce moment-là que les séquences d'ADN sont lues et que l'analyse du métagénome peut commencer. De nombreuses technologies de séquençage ont vu le jour



ces 10 dernières années, et pour l'étude des communautés microbiennes par métabarcoding, la technologie Illumina MiSeq est classiquement utilisée. En effet, il est nécessaire d'utiliser un séquenceur rapide, performant, pouvant séquencer un grand nombre d'échantillons, et surtout dont le taux d'erreurs de lecture est très faible. Ce dernier point est très important car une erreur de lecture peut mener à une surestimation de la diversité microbienne.

Une fois le séquençage effectué, un processus de nettoyage des séquences est alors engagé à l'aide d'outils bio-informatiques. Lors des premières analyses de séquençage, pour pallier aux possibles erreurs de lecture, les séquences étaient regroupées à un seuil d'identité nucléotidique représentant une espèce bactérienne ou fongique (généralement 97% ou 98% de similitude selon les marqueurs). Les groupes constitués étaient appelés Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU). L'assignation taxonomique était alors faite par alignement sur la base de données choisie, de la séquence la plus représentée dans un OTU donné, ou sur la séquence centrale du groupe (centroïde). Le regroupement en OTU dépend des séquences du jeu de données, de leur abondance et des erreurs de séquençage. Cela signifie que les listes d'OTUs obtenues dans deux jeux de données distincts ne peuvent être comparées entre elles, car elles sont spécifiques du jeu de données et du séquençage effectué. Cela constitue la principale limite de cette méthode d'agrégation (Callahan *et al.*, 2017).

C'est ainsi qu'un nouvel outil bio-informatique, dont la fonction principale est de prendre en charge les erreurs de séquençage, a été développé (DADA2, Callahan *et al.*, 2016). Les algorithmes développés dans cet outil permettent principalement de résoudre les erreurs de séquençage et de supprimer les séquences chimériques. Une fois ces étapes effectuées, il devient alors inutile de regrouper les séquences en OTU. DADA2 permet ainsi d'aligner les séquences entre elles et d'identifier chaque variant au nucléotide près. Chaque variant de séquence d'amplicon (ASV) possède donc une séquence unique, et l'assignation taxonomique est alors effectuée par alignement de séquences de chaque ASV avec la base de données choisie. Comme chaque ASV constitue une séquence unique, leur identité ne change pas entre deux jeux de données, et il devient alors possible de les comparer entre eux (Callahan *et al.*, 2016, 2017). Malgré cette discrimination fine des taxons, ces méthodes de type DADA2 conduisent à une surestimation de la diversité en raison de variants de copies au sein d'une même cellule bactérienne si le marqueur



**Figure 4 : Représentation schématique des différents niveaux de diversité.** L' $\alpha$ -diversité représente la diversité intra-échantillon. La  $\beta$ -diversité représente la diversité inter-échantillon. La  $\gamma$ -diversité représente la diversité entre plusieurs écosystèmes.



moléculaire utilisé est l'ARNr 16S par exemple (Johnson *et al.*, 2019). L'utilisation d'un marqueur moléculaire résolutif et d'une approche bio-informatique précise augmente ainsi la résolution des études sur les communautés microbiennes.

### *iii. Analyse de la diversité microbienne*

Une fois toutes ces étapes franchies, l'analyse de la diversité microbienne commence. En écologie des communautés il existe de nombreuses mesures de la diversité, qui constituent trois principaux niveaux : la diversité  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (**Fig. 4**).

La diversité  $\alpha$  représente la diversité d'un échantillon. Elle englobe la richesse spécifique observée, qui est le nombre réel (ou estimé) d'individus (OTU, ASV, taxons...) par échantillons, ainsi que plusieurs autres mesures de diversité intra-échantillon. Par exemple les indices de diversité de Shannon et l'inverse de Simpson sont deux métriques permettant d'estimer le nombre d'espèces (ou de taxons) différentes dans un échantillon : la valeur de l'indice augmente avec la diversité de l'échantillon (Shannon & Weaver, 1948; Simpson, 1949). Il est aussi possible de calculer l'équitabilité (Pielou, 1966) qui mesure si chaque espèce différente est représentée de manière équilibrée dans l'échantillon ou si certains taxons sont dominants (faible équitabilité). Enfin, une autre métrique de l' $\alpha$ -diversité est la mesure de la diversité phylogénétique que l'on peut calculer en additionnant la longueur des branches d'un arbre phylogénétique au sein d'un échantillon (Faith, 1992).

La diversité  $\beta$  est le second niveau de calcul de la diversité. Elle représente la diversité inter-échantillons et permet donc de comparer les échantillons les uns par rapport aux autres en fonction de leur composition en taxons, OTU ou ASV. Les principaux indices utilisés pour l'étude des communautés microbiennes sont l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis et l'indice de Jaccard. Le premier tient compte de l'abondance de chaque taxon (OTU ou ASV) pour mesurer la dissimilarité entre deux échantillons (Bray & Curtis, 1957), alors que le deuxième repose sur la binarité présence/absence (Jaccard, 1901). La principale différence entre ces deux indices est que seul l'indice de Jaccard donne autant de poids aux taxons rares qu'aux taxons abondants, alors que Bray-Curtis favorise les taxons abondants. Enfin, une troisième mesure de la  $\beta$ -diversité est la distance UniFrac qui tient compte de la relation phylogénétique des taxons (OTU ou ASV) entre les échantillons (Lozupone & Knight, 2005; Fouquier *et al.*, 2016). Il est possible de choisir



une mesure de distance UniFrac pondérée, c'est-à-dire quantitative tenant compte de l'abondance des taxons ou non-pondérée c'est-à-dire qualitative (présence/absence).

La représentation graphique classique de la  $\beta$ -diversité est une analyse en coordonnées principales (PCoA) effectuée à partir d'une matrice multidimensionnelle (MDS) : il s'agit donc d'une projection en 2 dimensions des points (échantillons) selon leur distance (ou dissimilarité).

Enfin, le troisième niveau de diversité est la diversité  $\gamma$ . Elle correspond à une étude à très large échelle dans laquelle la diversité est comparée entre différents écosystèmes (Fig. 4).

#### *iv. Culturomique*

Récemment, une nouvelle approche dans l'étude des communautés microbiennes a vu le jour. La culturomique est un retour à la microbiologie Pasteurienne associée aux méthodes moléculaires, qui tient compte de la fraction cultivable du microbiote étudié, afin de pouvoir la manipuler. En réalité quasiment tout est cultivable, mais bien souvent on ne connaît pas les conditions de culture adéquates. La culturomique consiste à cultiver et isoler autant de colonies que possible à partir d'un échantillon de l'environnement, puis à extraire leur ADN afin d'effectuer un typage à haut débit en utilisant les marqueurs moléculaires développés pour le barcoding (Fig. 3).

En couplant les connaissances du microbiote cultivable et non-cultivable, il est possible de sélectionner certaines souches selon différents critères (diversité, abondance, fonctions, ...) et les manipuler individuellement selon la question de recherche (Hu *et al.*, 2016; Gu *et al.*, 2020), ou recomposer des communautés avec des individus choisis, appelées communautés synthétiques (Vorholt *et al.*, 2017). Ces communautés synthétiques constituent un sous-ensemble de dimension réduite du microbiote, et peuvent ainsi servir à étudier des mécanismes écologiques ou fonctionnels avec un niveau de complexité réduit en comparaison avec des communautés microbiennes *in extenso* (Bai *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2017). Les limites à cette approche sont notamment la nécessité de trouver les milieux de culture adaptés et la difficulté de cultiver la diversité fongique. En effet, la majorité des milieux de culture ont été développés pour les bactéries, et les temps de croissance sont relativement homogènes pour de nombreux taxons bactériens. A l'inverse, bien que certains champignons arrivent à se développer sur des milieux



dédiés aux croissances bactériennes, il existe beaucoup moins de milieux adaptés, et leur vitesse de croissance est très hétérogène entre taxons, ce qui rend difficile l'isolement d'une grande diversité de champignons.

La culturomique et notamment la conception de communautés synthétiques est un secteur en pleine évolution et plusieurs techniques sont développées pour automatiser la constitution de multiples communautés synthétiques à partir d'un même microbiote de départ. On peut par exemple citer la technique de microfluidique par gouttelettes, principalement développée pour les bactéries, qui permet de construire et de caractériser simultanément de nombreuses communautés synthétiques (Kehe *et al.*, 2019).

#### v. *Autres outils d'analyse du microbiote*

Au-delà des connaissances sur la diversité des écosystèmes, il est également important de prendre en compte l'aspect fonctionnel des membres du microbiote, car plus important encore que leur présence, ce sont les fonctions qu'ils assurent qui sont essentielles à la santé et à la croissance de la plante (Etalo *et al.*, 2018). Des inférences fonctionnelles sur la base de marqueurs moléculaires utilisés en métabarcoding sont proposés par différents logiciels comme PICRUSt (Langille *et al.*, 2013) ou Tax4fun (Aßhauer *et al.*, 2015). Ces approches sont basées sur une corrélation entre structure taxonomique et composition fonctionnelle d'une communauté en utilisant les séquences génomiques de spécimens. Si ces approches permettent d'avoir accès aux grandes catégories fonctionnelles d'une communauté (métabolisme des sucres, acides aminés...), elles ne permettent pas d'estimer de manière robuste les familles de gènes associées aux communautés, notamment à cause des événements de transfert horizontal de gènes. La prédiction de la structure taxonomique et fonctionnelle d'une communauté est généralement plutôt effectuée par séquençage massif aléatoire, ou métagénomique. Cette méthode permet d'avoir accès à plus de gènes et donc de pouvoir prédire plus précisément les fonctions assurées au sein du microbiote, même sans assignation taxonomique. Il est également possible d'étudier le microbiote par métatranscriptomique (ARN) (Shakya *et al.*, 2019). Cette technique donne accès directement aux transcrits des gènes, et donc à leurs fonctions, mais n'identifie donc que les taxons les plus actifs dans la communauté microbienne à un moment donné. Par ailleurs l'extraction, la purification et le séquençage d'ARN sont autant d'étapes plus longues et plus coûteuses que pour l'ADN.

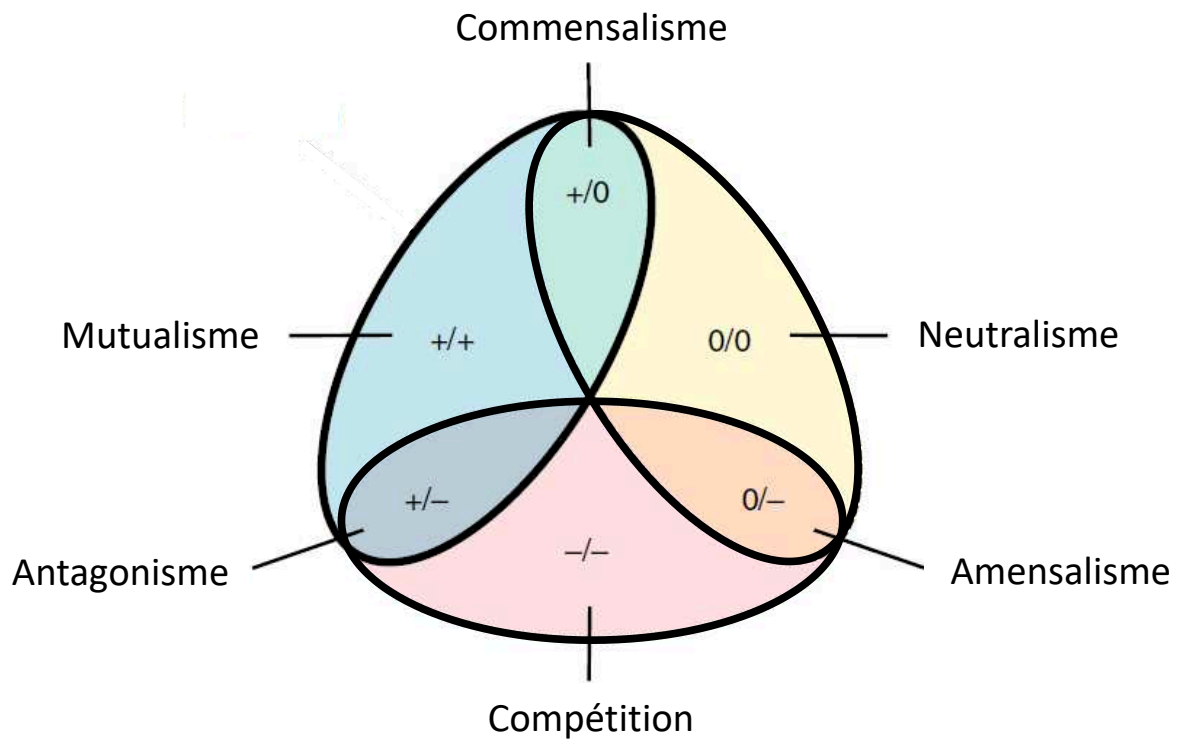


Figure 5 : Nature des interactions biotiques entre individus. Adaptée de Zélé *et al.*, 2018.

### c. Gamme d'interaction entre l'hôte et son microbiote

Les microorganismes ne font pas que cohabiter avec leur hôte, certains interagissent intimement avec lui, et participent à améliorer ou altérer sa fitness, c'est-à-dire sa capacité à survivre et à se reproduire. Pour vivre et se développer sur/dans leur hôte, les microorganismes se sont adaptés, certains ont co-évolué avec leur hôte, à un point tel qu'hôte et microorganisme sont parfois devenus co-dépendants, l'un ne pouvant survivre sans l'autre. Toutes ces notions sur lesquelles je reviendrai dans la suite de mon manuscrit, ne peuvent être introduites sans d'abord s'intéresser à la nature des relations qu'entretiennent les microorganismes avec leur hôte.

#### i. Symbiose

Lorsqu'une interaction s'établit entre deux individus différents, on parle de « symbiose » (Frank, 1877; de Bary, 1879). Certains jugent la symbiose comme étant une interaction exclusivement positive, probablement car ce terme a d'abord été employé pour décrire le lichen, fruit de l'interaction mutualiste obligatoire entre un champignon symbiotique et une algue (Sapp, 1994). Il s'agit pourtant d'un terme neutre regroupant en fait de nombreux types d'interactions dont l'effet peut être positif, neutre ou négatif pour tout ou partie des membres inclus dans l'interaction (Frank, 1877). Ainsi, le microbiote des plantes est constitué de microorganismes symbiotiques, certains sont commensaux, d'autres pathogènes, et d'autres encore n'ont aucun effet sur leur hôte. L'ensemble des interactions biotiques qui s'établissent entre le microbiote et son hôte, et entre microorganismes au sein du microbiote, ont été classées selon leur nature (positive, négative, neutre) (**Fig. 5**, voir également **Fig. 10**).

On parle de mutualisme lorsqu'un microorganisme et sa plante hôte ont des interactions qui favorisent les deux partenaires. C'est le cas des champignons mycorhiziens et des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) comme les *Rhizobium* qui favorisent l'absorption de phosphore et d'azote par les racines de la plante et la protègent contre certains pathogènes (Bais *et al.*, 2004; Heijden *et al.*, 2008). En retour ces microorganismes reçoivent grâce à la plante des nutriments riches en sucres pour se développer. Il existe également de nombreux cas dans lesquels les microorganismes tirent de la plante de quoi se développer sans ne donner en retour aucun avantage à la plante en terme de fitness. C'est ce qu'on appelle le commensalisme. Au contraire, si un microorganisme tire bénéfice des ressources de la plante au détriment



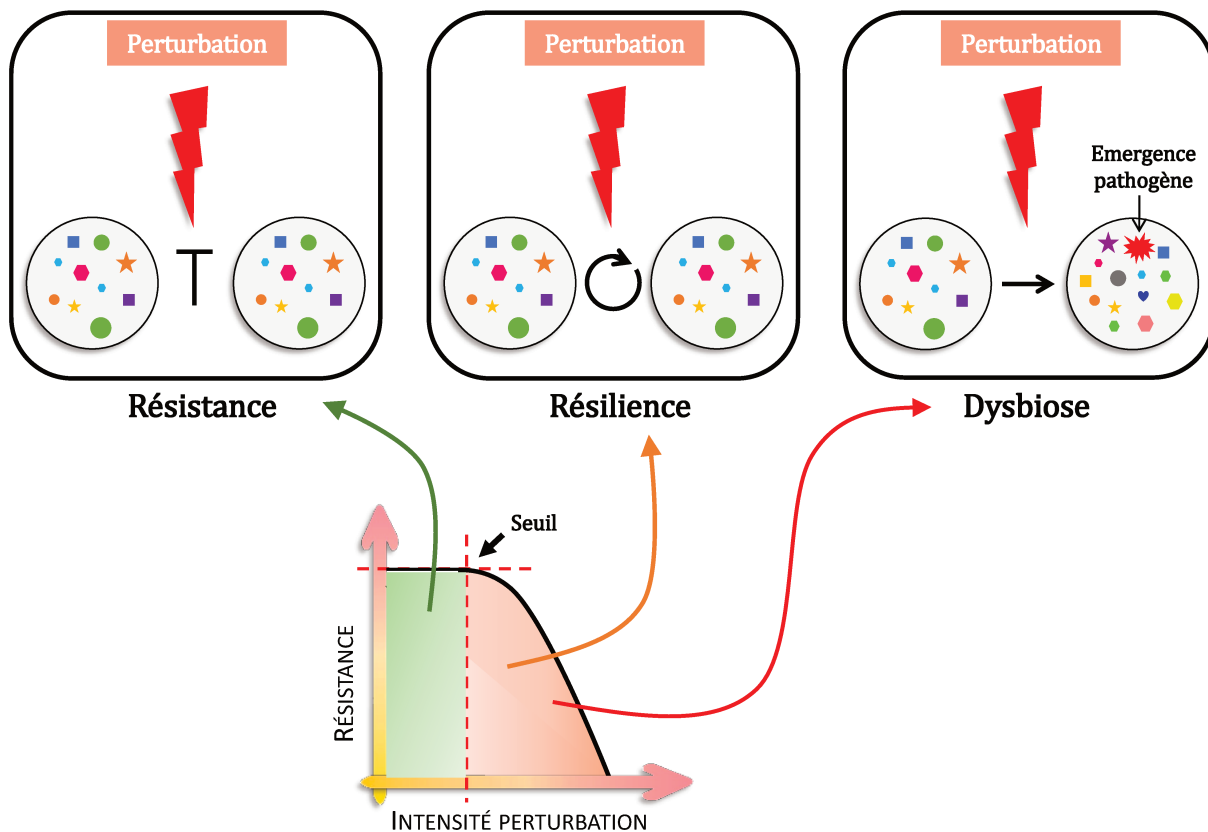


de sa santé ou sa croissance, il s'agit alors d'antagonisme ou de parasitisme. C'est le cas des microorganismes phytopathogènes, qui infectent la plante et provoquent des maladies. Mutualisme, commensalisme et antagonisme sont les trois interactions majoritaires qui s'établissent entre plantes et microorganismes (Schirawski & Perlin, 2018). Ces interactions concernent également les microorganismes eux-mêmes et peuvent être de nature encore plus diverses (neutralisme, amensalisme, compétition) et donc complexes, et peuvent indirectement favoriser ou réduire la fitness de la plante (Bakker *et al.*, 2014; Zélé *et al.*, 2018; Hassani *et al.*, 2018) (Fig. 5).

Dans certains cas, les interactions symbiotiques entre un microorganisme et sa plante hôte deviennent tellement intimes que l'un ne peut survivre sans l'autre. C'est ce qu'on appelle la symbiose obligatoire. Ce type d'interaction est l'image d'une co-évolution entre les deux partenaires, les rendant interdépendants. Par exemple, le champignon *Epichloë festucae* est naturellement présent à l'intérieur des parties aériennes de certaines fétuques (Poacées) et ne sort jamais de la plante pour accomplir son cycle sexué. Il est ainsi transmis par la graine de générations en générations (Liu *et al.*, 2017). Il protège la plante contre des insectes phytophages et favorise sa résistance à la sécheresse (Vázquez-de-Aldana *et al.*, 2013). Le second exemple concerne la bactérie *Orreella dioscoreae* qui vit dans des nodules foliaires de la liane (*Dioscoreae* sp.). La bactérie est très difficilement cultivable hors de la plante, et sans la bactérie, la plante fait preuve d'une très grande difficulté à croître (Pinto-Carbó *et al.*, 2018; De Meyer *et al.*, 2019). Cependant, mis à part quelques rares exemples, très peu d'études font état de symbioses obligatoires chez la plante.

## ii. Dysbiose

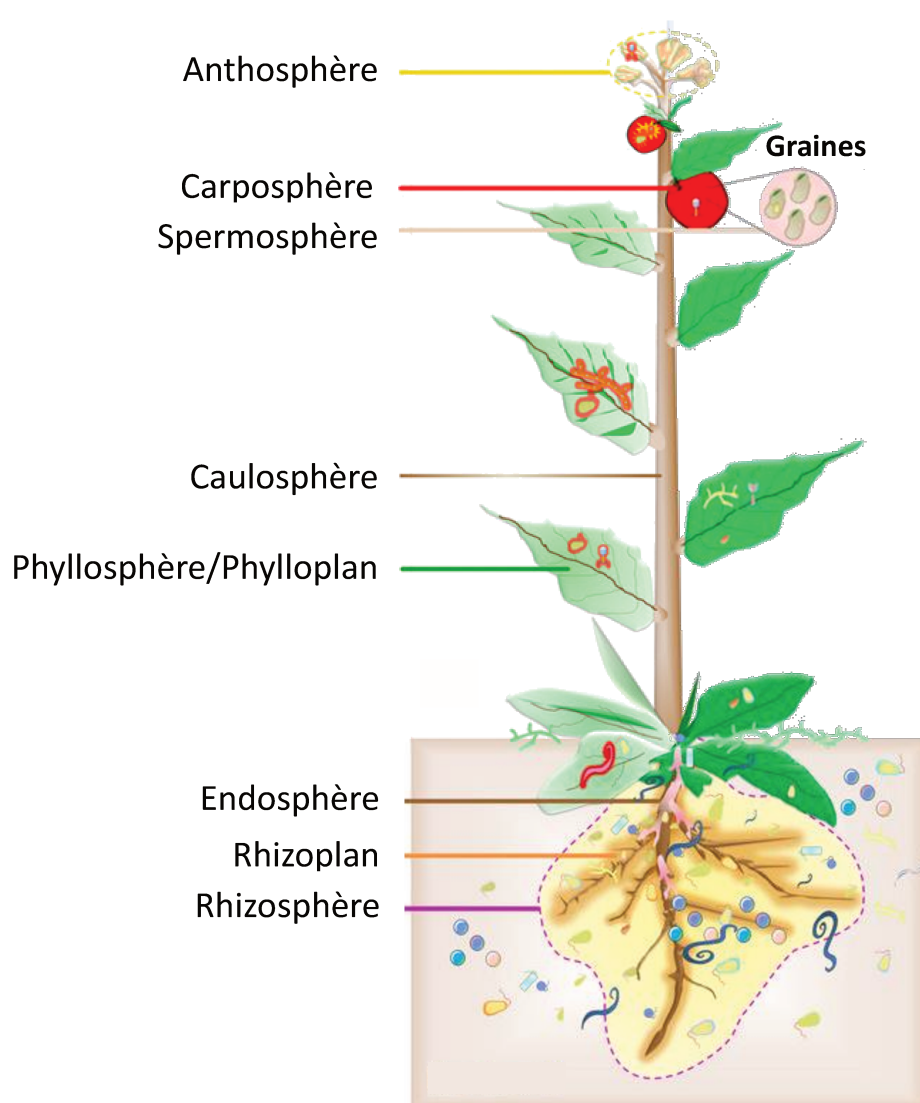
Certaines perturbations biotiques et abiotiques peuvent provoquer un déséquilibre dans les interactions entre l'hôte et son microbiote, conduisant à des modifications de la composition du microbiote. En effet, le microbiote est résistant aux perturbations jusqu'à un certain point, mais passé ce seuil de résistance, il peut être affecté dans sa diversité, son abondance et sa composition. A la suite de ces changements, le microbiote peut soit retourner à un état stable proche de celui d'origine, c'est ce qu'on appelle la résilience, ou adopter une configuration alternative. Dans ce dernier cas, des changements dans l'abondance relative des membres du microbiote et de leur identité peuvent survenir. Les interactions entre l'hôte et son microbiote n'étant pas statiques, il



**Figure 6 : Différentes réponses d'un microbiote à une perturbation de son environnement.** La résistance du microbiote dépend de l'intensité de la perturbation (zone verte). Passé un certain seuil (ligne verticale en pointillés rouges), le microbiote réagit à la perturbation de deux manières. Dans ce cas, soit il retourne à une conformation initiale stable (résilience), soit il adopte une configuration alternative différente du microbiote initial et dans laquelle certains pathogènes peuvent par exemple émerger (dysbiose).

peut arriver que certaines espèces opportunistes, jusqu'alors commensales, deviennent pathogènes. Ce déséquilibre dans les interactions hôte-microbiote est appelé « dysbiose » (Fig. 6). Ce terme est largement utilisé en médecine pour décrire les perturbations au sein du microbiote intestinal provoquant des maladies ou une réponse immunitaire (Scheunert, 1920; Hooks & O'Malley, 2017). Par exemple, plusieurs études ont mis en évidence qu'une dysbiose au sein du microbiote intestinal pouvait conduire à un enrichissement de certaines bactéries favorisant le développement de maladies auto-immunes ou inflammatoires (Round & Mazmanian, 2009). Il est par ailleurs possible de sortir ou d'éviter une dysbiose par la consommation de probiotiques, ou par transplantation fécale, afin de revenir à une certaine stabilité et favoriser la résilience du microbiote intestinal (Sommer *et al.*, 2017; Fong *et al.*, 2020).

Ce phénomène est également observable chez les plantes et l'enjeu pour leur santé est tel que de plus en plus de recherches se concentrent sur les causes et conséquences d'une dysbiose, et comment favoriser la résistance face à un stress et la résilience d'un microbiote stable (Chen *et al.*, 2020; Lei, 2020). A l'image des probiotiques, il est par exemple possible de transformer un sol dit « sensible » (dans lequel un agent pathogène peut provoquer une gravité élevée de maladie sur la plante) en un sol suppressif (c'est-à-dire réduisant l'impact du parasite sur la plante malgré sa présence) en inoculant certains microorganismes antagonistes du parasite ou en y incorporant une fraction d'un autre sol suppressif. Ainsi, les plantes pourront s'y développer parce que l'impact du parasite sur la plante sera très réduit (Brugman *et al.*, 2018). Les sols suppressifs ont été décrits pour de nombreux pathogènes telluriques des plantes (Berendsen *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Raaijmakers & Mazzola, 2016). Par exemple, l'implication de consortia de bactéries et champignons du sol dans l'inhibition d'une maladie provoquée par le champignon *Rhizoctonia solani* a été démontrée chez la canne à sucre (Mendes *et al.*, 2011). De même concernant la maladie du piétin-échaudage du blé, causée par le champignon *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, il a été montré qu'une monoculture de blé sur plusieurs années réduit *in fine* l'impact du pathogène. Cette suppression de la maladie est liée à une modification de la composition microbienne du sol rhizosphérique (Sanguin *et al.*, 2009) au cours du temps, favorisant la présence de certaines bactéries inhibitrices de la maladie telles que des populations du complexe d'espèces *Pseudomonas fluorescens* (Mazzola, 2002; Sanguin *et al.*, 2008).



**Figure 7 : Les différents habitats de la plante.** Les microorganismes colonisent différentes niches sur et à l'intérieur des tissus végétaux. De bas en haut : la rhizosphère désigne la zone du sol soumise à l'influence des racines; le rhizoplan concerne la surface des racines; l'endosphère désigne les habitats intérieurs de la plante; le phylloplan est l'habitat de la surface des feuilles, l'ensemble des habitats feuilles étant désignés comme la phyllosphère; la caulosphère est l'habitat tige (ou tronc), la spermosphère est spécifiquement désignée comme la zone du sol soumise à l'influence des graines en germination, sinon on parle simplement d'habitat graine; la carposphère est l'habitat fruit; enfin l'anthosphère est l'habitat fleur. Adapté de Shelake *et al.*, 2019.

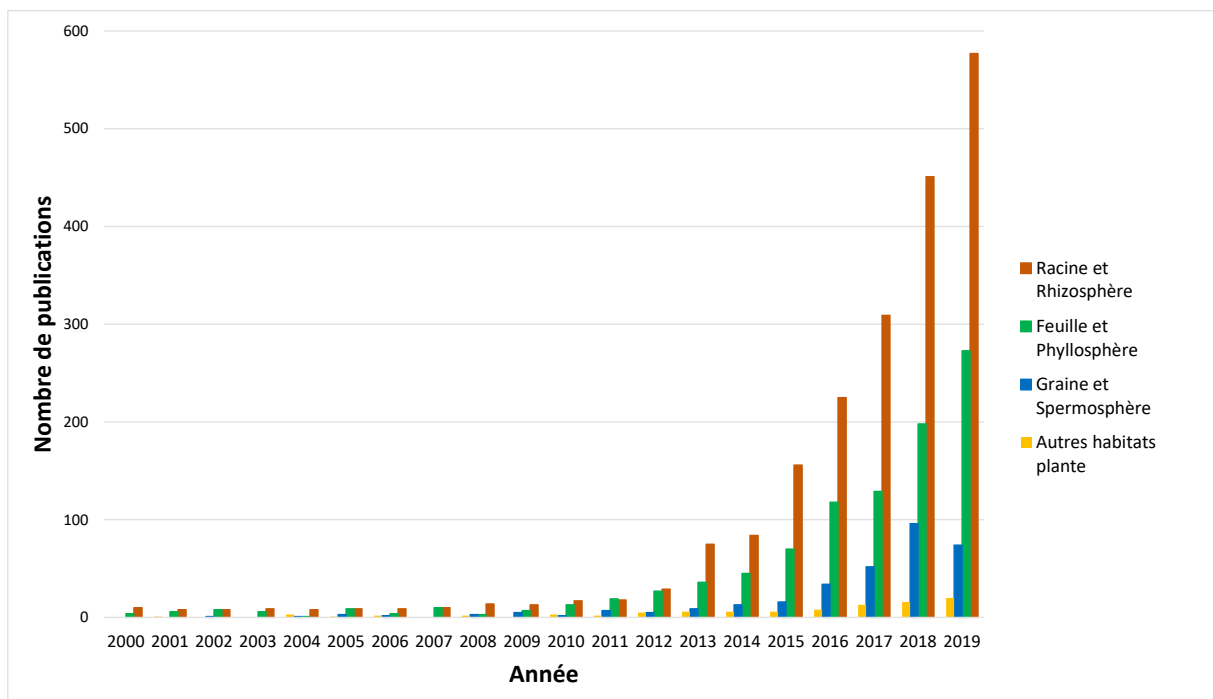
## 2. LES SPECIFICITES D'HABITATS DE LA PLANTE

La plante abrite un microbiote diversifié et spécifique de chaque compartiment végétal. Il existe un nom pour désigner chaque habitat du microbiote de la plante. On distingue ainsi le microbiote de la feuille du microbiote de la racine, de la graine, des fleurs, des fruits ou encore des tiges. Par ailleurs, chez la plante on distingue les épiphytes, microorganismes vivant à la surface des tissus (Andrews & Harris, 2000), des endophytes, ceux vivant dans l'endosphère, c'est-à-dire à l'intérieur des tissus de la plante (Turner *et al.*, 2013) (**Fig. 7**).

### a. Endophytes et épiphytes

Dans le microbiote des plantes, les épiphytes sont les microorganismes vivant et se développant à la surface des tissus de la plante. La diversité microbienne des épiphytes est assez élevée et renouvelée très fréquemment notamment sur les parties aériennes, au gré des variations environnementales et des migrations. En effet, à la surface de la plante et notamment des feuilles, les microorganismes doivent résister à de nombreux stress comme le gel, la pluie, les changements physiologiques de la feuille, ou encore l'exposition aux UVs (Lindow, 1996; Lindow & Leveau, 2002). Certaines bactéries ont par exemple la capacité de vivre en biofilm ou de former des micro-agrégats à la surface des feuilles afin de mieux résister aux stress environnementaux (Monier & Lindow, 2004, 2005).

Les endophytes sont en interaction intime avec les tissus de la plante et sont généralement moins nombreux et diversifiés que les épiphytes (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012). Ces microorganismes sont capables de se développer entre les cellules de l'hôte et de coloniser différents habitats de la plante (Compant & Vacher, 2019). En métabarcoding, il est difficile de distinguer avec certitude les endophytes des épiphytes. En effet les stérilisations de surface réalisées sur les tissus végétaux ne permettent pas nécessairement d'éliminer l'ensemble des épiphytes (notamment pour ceux organisés en biofilm) et quand bien même ces stérilisations seraient efficaces, l'ADN résiduel peut être amplifié et augmente artificiellement le pool d'endophytes. Ainsi la méthode de choix pour répertorier un microorganisme endophyte reste la microscopie. Par exemple, il est prouvé par microscopie qu'une bactérie du genre *Burkholderia*, initialement présente à la surface des racines, peut entrer dans celles-ci puis remonter par le xylème jusque dans les feuilles de vigne (Compant *et al.*, 2005). De nombreux autres



**Figure 8 : Nombre de publications traitant du microbiote des plantes selon l'habitat depuis les années 2000.** Les données ont été obtenues avec le site de publications scientifiques Web of Science en utilisant des équations de recherche incluant les noms d'habitat de la plante suivis de la formule : microbiota OR microbiome\* OR (microbial communit\*). Autres habitats plante = tiges, fleurs et fruits.

microorganismes initialement présentes dans le sol, sont capables d'entrer dans les racines (Compant *et al.*, 2010; Compant & Vacher, 2019).

Chez la plante, les champignons mycorhiziens sont très étudiés pour leur capacité à se lier intimement aux racines de l'hôte dans une interaction mutualiste. Certains sont dits ectomycorhiziens si leurs hyphes se développent entre les cellules de l'hôte, ou endomycorhiziens s'ils pénètrent dans les cellules (Huey *et al.*, 2020). Les Rhizobactéries sont capables d'entrer en symbiose avec les racines. Par exemple, la bactérie *Sinorhizobium meliloti* est capable de pénétrer dans les racines de *Medicago truncatula* puis d'entrer dans les cellules végétales par endocytose. Ce processus est induit par la production de composés aromatiques par la plante, les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont reconnus par la bactérie qui en réponse va sécréter des molécules appelées facteur de nodulation (Nod). Les facteurs Nod vont favoriser la prolifération de la bactérie jusqu'à la racine et induire la nodulation des cils racinaires. C'est par ces nodosités que la bactérie pénètre dans les racines. Bien que l'on parle d'infection, il s'agit d'une symbiose mutualiste dans laquelle la bactérie va fixer l'azote atmosphérique et le réduire en ammonium assimilable par la plante, en échange de quoi la plante va lui fournir les nutriments nécessaires à sa croissance (Jones *et al.*, 2007).

#### **b. Graine et spermosphère**

En comparaison avec la racine et la feuille, le microbiote de la graine et de la spermosphère, la zone du sol soumise à l'influence de la graine en germination, ont été à ce jour moins caractérisés (**Fig. 8**). Comme nous le verrons dans la partie qui lui est consacrée, la graine joue pourtant un rôle clé dans la transmission de microorganismes d'une génération à l'autre. La principale raison de cet intérêt plus tardif est que la graine a longtemps été considérée comme un organe exempt de microorganismes internes, tout du moins. Cependant, la graine héberge un microbiote dont la diversité et la structure varient fortement en fonction de l'espèce de plante, mais également d'une graine à l'autre.

La plupart des études sur le microbiote de la graine sont dédiées aux endophytes car ces derniers sont généralement associés à une transmission verticale et donc une potentielle co-évolution avec l'hôte. Cependant il est difficile de valider avec certitude que les membres du microbiote sont vraiment endophytes car les méthodes de stérilisation des graines « en surface » (trempages dans Javel, éthanol et eau) ne peuvent pas toujours garantir une absence totale des microorganismes épiphytes, qui peuvent persister sous





forme de biofilms dans les interstices de la surface de la graine. Dans tous les cas, tant les épiphytes que les endophytes ont leur part d'implication dans la fitness de la plante (Shade *et al.*, 2017) et il est important de tous les prendre en compte dans les études sur le microbiote de la graine. Plusieurs exemples de leur importance et leur impact seront illustrés dans la partie de ce manuscrit consacrée à la graine.

### c. Rhizosphère et phyllosphère

La racine et la zone du sol soumise à son influence, la rhizosphère (Hiltner, 1904), sont les habitats microbiens les plus documentés dans la littérature (**Fig. 8**). En effet la communication entre la racine et le sol dans lequel elle se développe est une des bases de recherche pour promouvoir la santé et la croissance de la plante (Berendsen *et al.*, 2012). Certains microorganismes de la racine et de la rhizosphère facilitent l'absorption de nutriments par la plante, la protègent contre les stress abiotiques et les pathogènes, influencent sa croissance et sont capables de moduler ses défenses immunitaires (Kwak *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2020), d'autres encore semblent ne pas jouer de rôle direct, mais leur présence est pourtant indispensable pour le maintien et la stabilité de l'ensemble de la communauté microbienne (Berendsen *et al.*, 2012).

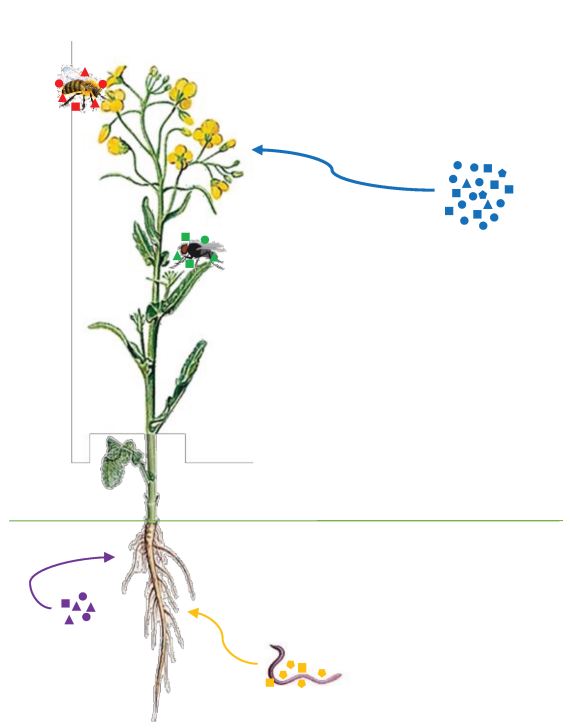
La racine peut être subdivisée en deux habitats distincts : l'intérieur de la racine c'est-à-dire l'endosphère et la surface de la racine appelée le rhizoplan (Hartmann *et al.*, 2008). Dans la rhizosphère, les communautés microbiennes sont très diversifiées et on estime leur richesse à  $10^8$ - $10^9$  cellules bactériennes et  $10^5$ - $10^6$  cellules fongiques par gramme de sol rhizosphérique (Mendes *et al.*, 2013). Le microbiote de la rhizosphère est très actif, et participe aux échanges moléculaires entre la plante et le sol (Faure *et al.*, 2009). Le sol est un réservoir riche et diversifié de microorganismes pour la plante. En fonction de la zone géographique, de la nature et des propriétés physico-chimiques du sol, les communautés microbiennes varient beaucoup mais sont en général dominées par deux phyla bactériens : les *Proteobacteria* et les *Actinobacteria* (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018). Il est très difficile de connaître la richesse microbienne d'un sol, mais certaines études estiment que la richesse bactérienne est de l'ordre de  $10^7$  et le nombre d'OTU bactérien peut monter jusqu'à 6000 par gramme de sol (Roesch *et al.*, 2007). A l'interface entre le sol et la racine, la richesse et la diversité du microbiote change graduellement. L'abondance et la diversité dans la rhizosphère est très différente de celle du sol, l'activité des microorganismes sélectionnés par les exsudats de la plante augmente et la



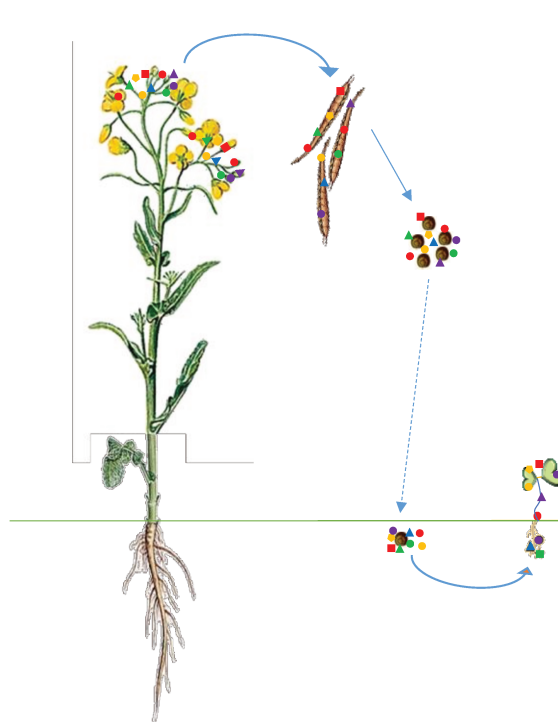
disponibilité en nutriments fournis par les racines favorise la prolifération microbienne. En résulte une diversité de taxons similaire voire inférieure à celle du sol environnant, mais une abondance de taxons spécifiques qui augmente. A la surface des racines (*i.e* le rhizoplan), les microorganismes sont plus spécifiquement sélectionnés par la plante, où son système immunitaire est très actif. La diversité taxonomique y est donc plus faible que dans la rhizosphère, et les fonctions associées aux taxons sélectionnés sont plus spécifiques (Hacquard *et al.*, 2017). Enfin, dans l'endosphère, seuls les microorganismes aptes et invités à entrer à l'intérieur des racines sont présents. Leur richesse et leur diversité est encore réduite (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015).

Les parties aériennes et plus spécifiquement les feuilles constituent le deuxième habitat de la plante le plus étudié (**Fig. 8**). La phyllosphère est à l'interface entre la plante et l'air. Du fait de leur large surface, les feuilles sont continuellement et directement soumises aux contraintes environnementales aériennes, et particulièrement climatiques (exposition aux UV, stress hydrique, variations de température, vent). Une grande partie du microbiote de la phyllosphère (structure, activité...) fluctue donc selon ces contraintes (Lindow & Brandl, 2003; Cordier *et al.*, 2012; Vorholt, 2012). Par exemple, une grande partie des microorganismes isolés de la surface des feuilles sont pigmentés du fait de leur exposition à lumière, les rendant ainsi plus résistants aux UV. De plus, la majorité des microorganismes retrouvés dans la phyllosphère et particulièrement à la surface des feuilles provient de différentes sources (insectes, mouvements d'air, pluie, sol), et les migrations de microorganismes provenant d'autres compartiments sont plus nombreuses que dans le sol, ce qui augmente la fluctuation des communautés microbiennes des feuilles. Par ailleurs, les microorganismes se développant à la surface des feuilles doivent tolérer une faible disponibilité en nutriments (Stone *et al.*, 2018). Cependant, malgré ces contraintes, des taxons, notamment bactériens s'adaptent et se maintiennent dans la phyllosphère, et certains jouent un rôle dans la protection de la plante contre les pathogènes (Ritpitakphong *et al.*, 2016). Les bactéries du genre *Methylobacterium*, *Sphingomonas* et *Pseudomonas* sont des taxons majeurs de la phyllosphère, notamment du fait qu'elles sont capables d'utiliser différents glucides comme source d'énergie. De plus, les bactéries du genre *Methylobacterium* captent le méthanol relâché par les feuilles et l'utilisent comme source de carbone (Delmotte *et al.*, 2009). On estime à  $10^6$ - $10^7$  le nombre de cellules bactériennes par  $\text{cm}^2$  de surface foliaire (Liu *et al.*, 2020).

### Transmission horizontale



### Transmission verticale



**Figure 9 : Modes de transmission du microbiote des plantes.** La transmission horizontale correspond à l'acquisition de microorganismes à partir de l'environnement (insectes, sol, bioaérosols...). La transmission verticale correspond à la transmission de microorganismes d'une génération à l'autre par la graine.

Le microbiote de la rhizosphère et de la phyllosphère sont principalement composés des mêmes phyla bactériens (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*) et fongiques (*Ascomycota* et *Basidiomycota*) (Bulgarelli *et al.*, 2012; Bodenhausen *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2015; Gkarmiri *et al.*, 2017). Cependant des différences de structure et d'abondance de ces microbiotes existent à des niveaux plus fins dans la classification taxonomique, et sont régies par ce que l'on appelle les spécificités d'habitat. En effet, la racine et la feuille ne sont pas soumises aux mêmes contraintes environnementales, l'une étant contrainte par le sol, l'autre par l'air, et les propriétés physico-chimiques de ces habitats ne sont pas les mêmes, les microorganismes y évoluent et s'y adaptent donc différemment. Counce *et al.* ont par exemple montré que la composition des communautés fongiques associées à la phyllosphère dépend principalement de la température, tandis que celle des racines est également contrainte par le pH du sol (Counce *et al.*, 2014). Au sein même du microbiote de la racine, des différences de structure taxonomiques sont observées entre la rhizosphère, le rhizoplan et l'endosphère (Bulgarelli *et al.*, 2012; Edwards *et al.*, 2015; Hacquard *et al.*, 2017; Gkarmiri *et al.*, 2017), illustrant une organisation fine et complexe de ces assemblages microbiens, médiée par la plante.

### 3. TRANSMISSION ET ASSEMBLAGE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES

#### a. Transmission du microbiote et concept de l'holobionte

##### i. Transmission horizontale

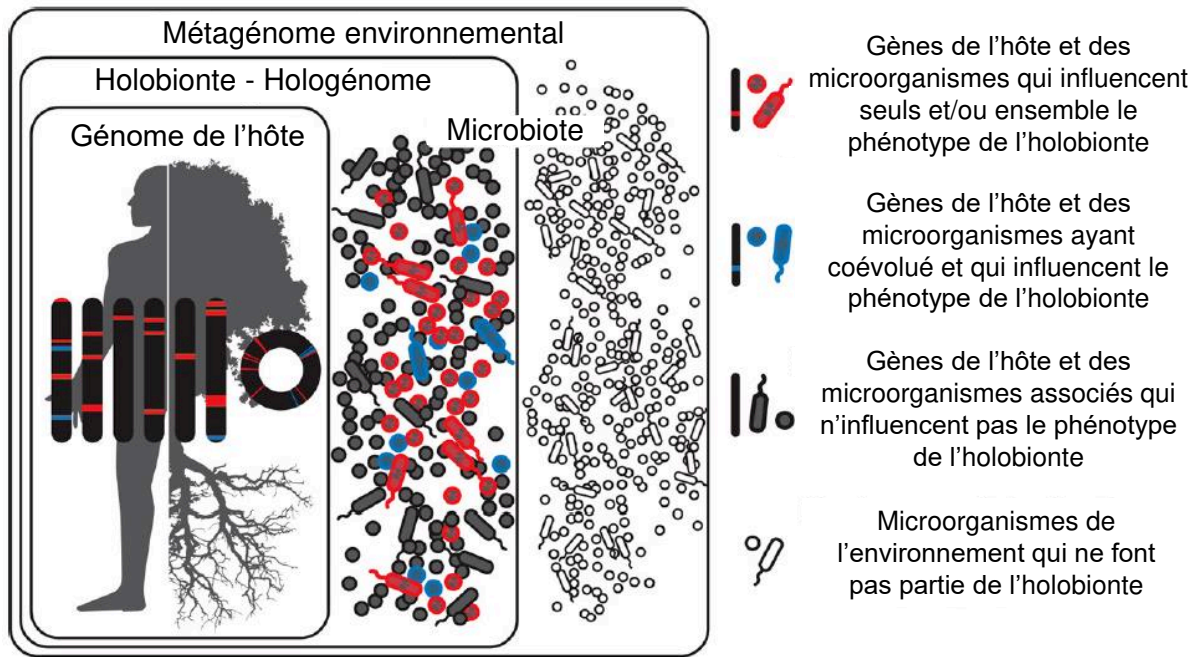
Il existe deux modes de transmission du microbiote de la plante : la transmission horizontale et la transmission verticale (Fig. 9). La plus importante est la transmission horizontale qui correspond à l'acquisition de microorganismes à partir de l'environnement. L'acquisition du microbiote par le sol est sans doute le mode de transmission horizontale le plus étudié, étant donné que le sol constitue une importante source de microorganismes pour le microbiote des racines (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012). Les insectes, et notamment les pollinisateurs sont également de bons vecteurs de microorganismes pour la plante. Voyageant de fleur en fleur à la recherche de pollen, ils transportent avec eux de nombreux microorganismes qu'ils transmettent aux plantes voisines. On peut citer de nombreux exemples de transmission horizontale de microorganismes par les insectes aux parties aériennes de la plante (Alekklett *et al.*, 2014; Ushio *et al.*, 2015; McFrederick *et al.*, 2017; Prado *et al.*, 2020), mais



certaines insectes favorisent également la transmission de microorganismes aux parties racinaires. Par exemple, une étude récente a mis en évidence que la bactérie *Pseudomonas protegens* est transmise de racines en racines par la mouche du chou *Delia radicum* (Flury *et al.*, 2019). Les perturbations météorologiques telles que le vent ou la pluie, transportent également des microorganismes, et assurent une part de la transmission horizontale du microbiote de la plante (Lindemann & Upper, 1985; Morris *et al.*, 2008; Palmero *et al.*, 2011).

#### *ii. Transmission verticale*

Bien que la plante acquière majoritairement son microbiote à partir de l'environnement, elle peut également recevoir une partie de son microbiote de manière verticale. Comme son nom l'indique, la transmission verticale correspond à la transmission de microorganismes d'une génération à l'autre. Chez l'Homme, de nombreuses recherches ont mis en évidence la transmission verticale de microorganismes de la mère à l'enfant pendant la grossesse, au moment de l'accouchement et au cours de l'allaitement. Ces microorganismes transmis par la mère sont les premiers constituants du microbiote intestinal du nourrisson (Butel *et al.*, 2018). Chez les plantes à reproduction végétative la transmission verticale est assurée *via* les organes de multiplication (bulbes, stolons, les rhizomes, tubercules). C'est ainsi que des chercheurs ont montré que la plante *Glechoma hederaceae* (lierre terrestre) transmet une partie de son microbiote à sa descendance clonale *via* les stolons (Vannier *et al.*, 2018). Chez les spermatophytes, la plante utilise la graine pour assurer la transmission verticale de microorganismes à la génération future. Les différentes voies de transmission de microorganismes de la plante à la graine seront décrites dans une partie consacrée à la graine. La transmission verticale peut être considérée comme avantageuse du fait qu'elle assure un héritage à la descendance de quelques microorganismes bénéfiques bien adaptés, que la plantule n'aura pas à capter de son environnement. Comme peu de taxons sont effectivement transmis, cela permet à la plantule de dépenser plus d'énergie dans sa croissance que dans le maintien de nombreux microorganismes, qu'elle peut ensuite recruter par transmission horizontale (Wilkinson & Sherratt, 2001). Cependant, il sera détaillé plus tard dans ce manuscrit que la transmission verticale inclut également certains microorganismes phytopathogènes.



**Figure 10 : Représentation de l'holobionte.** Un holobionte est une entité comprenant l'hôte (ici un Homme, un arbre) et tous les microorganismes qui lui sont associés. Parmi ces microorganismes, certains influencent un phénotype de l'holobionte et ont coévolué avec l'hôte (bleu), d'autres influencent un phénotype de l'holobionte mais n'ont pas co-évolué avec l'hôte (rouge), et d'autres n'influencent pas du tout le phénotype de l'holobionte (gris). Les phénotypes de l'holobionte peuvent changer dans le temps et l'espace à mesure que les microorganismes entrent et sortent de l'holobionte. Les microorganismes de l'environnement ne font pas partie de l'holobionte (blanc). L'hologénome englobe les génomes de l'hôte et de tous ses microorganismes associés à un moment donné. Adapté de Theis *et al.*, 2016.



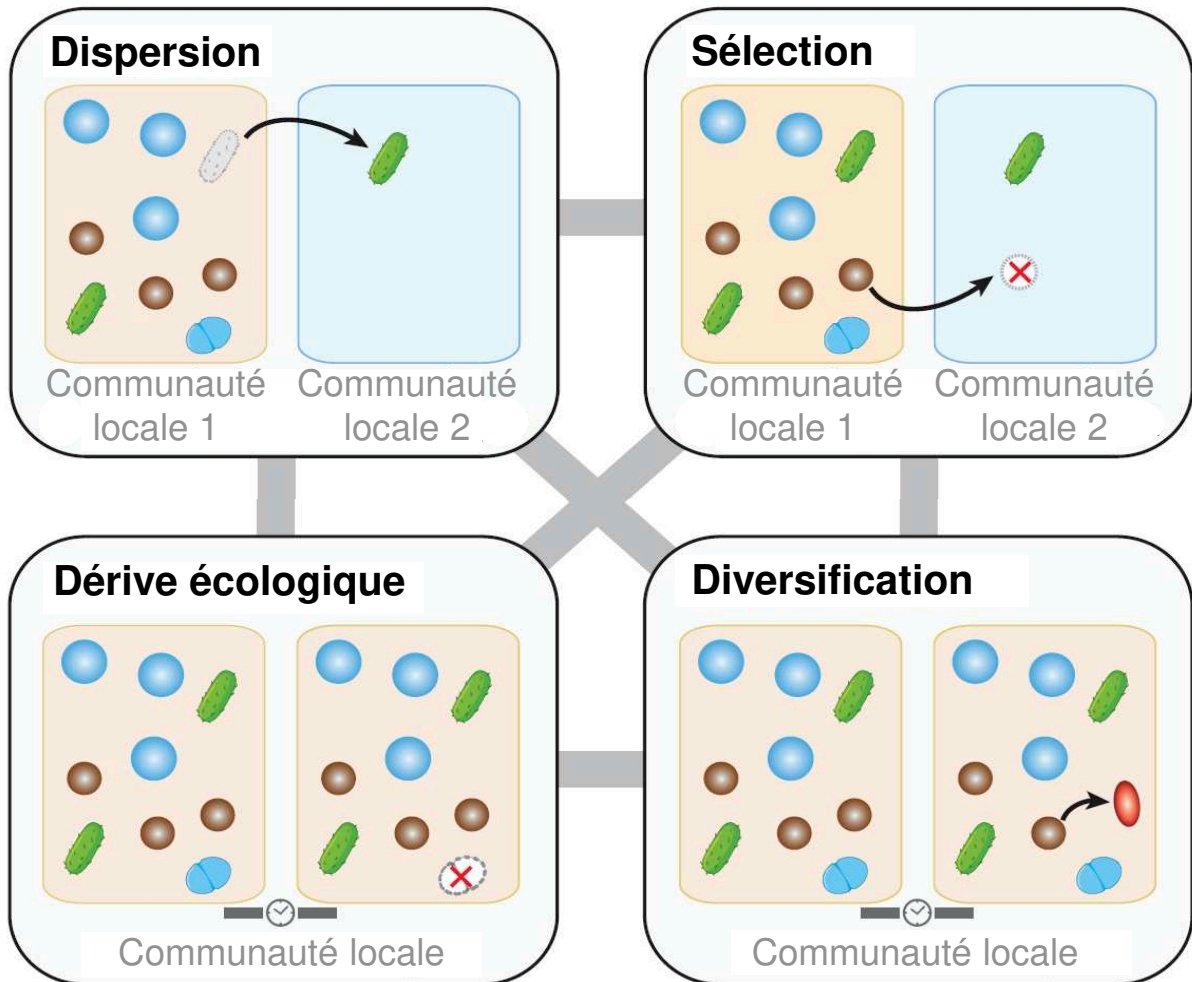
### *iii. L'holobionte*

La plante et son microbiote peut être considéré comme un méta-organisme ou holobionte. C'est à Lynn Margulis, mère de la théorie endosymbiotique, que l'on doit le terme d'holobionte (Margulis & Fester, 1991). Cependant c'est l'américain Forest Rohwer qui en donna la définition qui intéresse aujourd'hui les chercheurs en écologie (Rohwer *et al.*, 2002). Ce terme vient du grec *hólos* (« tout ») et *bios* (« vie ») et désigne une unité biologique complexe composée d'un macroorganisme (un animal, une plante) et des microorganismes qu'il héberge. Sur le même principe, l'hologénome a été défini comme l'ensemble des génomes de l'holobionte (**Fig. 10**). Ce concept de l'holobionte est aujourd'hui largement débattu au sein de la communauté scientifique. En effet si l'association entre un hôte et son cortège de micro-organismes est acceptée par l'ensemble de la communauté, la notion de co-évolution entre ces entités reste à démontrer (Bordenstein & Theis, 2015; Moran & Sloan, 2015; Douglas & Werren, 2016; Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018). En effet ne plus considérer l'organisme et son propre génome, mais considérer que l'ensemble de plusieurs génomes constituent une seule unité remet en question la notion même d'individu et d'entité biologique (Douglas & Werren, 2016).

La plante et son microbiote évoluent constamment (variation de diversité, modifications physiologiques, tailles d'habitat...). Comment alors définir les limites de l'holobionte et de l'hologénome quand des individus sélectionnés vont et viennent continuellement, quand des génomes, des fonctions apparaissent et disparaissent ? Dans notre modèle, une question se pose alors : à quelle échelle doit-on placer l'holobionte ? A l'échelle de la plante et son microbiote ? Ou à l'échelle d'interactions plus fines entre des symbiotes et un compartiment spécifique de l'hôte (graine, racine, feuille, ou encore endosphère), à un moment précis de son cycle de croissance ? L'utilisation de tout ou partie de ce concept et la définition que l'on doit retenir dépend donc de la question à laquelle on souhaite répondre (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015).

#### **b. Processus écologiques impliqués dans l'assemblage**

Un cadre conceptuel a été établi pour analyser l'assemblage des communautés microbiennes. Il distingue quatre grands principes écologiques définis par Vellend (2010) : la sélection, la diversification, la dispersion et la dérive écologique. Ceux-ci seront décrits séparément, mais en réalité chacun d'entre eux participe avec plus ou moins de poids à



**Figure 11 : Processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des plantes.** La dispersion est illustrée par le mouvement de microorganismes entre des communautés locales. La sélection est ici le résultat de conditions abiotiques affectant l'établissement d'un microorganisme dans une communauté. La dérive écologique est le résultat de changements stochastiques dans les tailles de population résultant ici en l'extinction d'un taxon particulier. La diversification est le processus qui génère de la variation génétique, illustrée ici au sein d'une communauté locale. Les croix rouges indiquent l'établissement infructueux d'un organisme (sélection) ou sa disparition (dérive écologique). Adapté de Cordovez *et al*, 2019.

l'assemblage des communautés microbiennes, et c'est de la contribution de tous ces processus que résulte l'assemblage des communautés microbiennes des plantes (**Fig. 11**).

### *i. La sélection*

Parmi les processus écologiques impliqués dans l'assemblage des communautés microbiennes associées aux plantes, la sélection est le plus étudié et documenté dans la littérature (Nemergut *et al.*, 2013). La sélection est basée sur les différences de succès reproducteur (fitness) entre individus vis-à-vis de leur environnement, mesurées par leur survie et leur fécondité (Vellend, 2010). La sélection est de ce fait considérée comme le processus majeur participant à l'assemblage du microbiote des plantes. Elle peut être médiée par l'environnement et/ou par l'hôte et résulte en une modification de la structure du microbiote et de l'abondance de certains taxons, selon leur fitness.

La sélection du microbiote par l'hôte dépend de nombreux traits de la plante et notamment de sa nature phylogénétique (*i.e.* son génotype). De par ses caractéristiques génétiques et son système immunitaire, la plante exerce une pression de sélection, autorisant certains microorganismes à se développer et à interagir avec elle, et en excluant d'autres (Kohl, 2020). L'impact du génotype de l'hôte sur la structuration de son microbiote sera développé ultérieurement. Comme je l'ai laissé entrevoir dans les parties précédentes, la sélection par l'hôte tient également compte des spécificités d'habitat : le microbiote de la plante n'est pas homogène d'un habitat à l'autre et sa structure varie au cours de la croissance de la plante (Fitzpatrick *et al.*, 2020). Entre racine et feuille par exemple, la sélection est différente du fait des spécificités physiques, chimiques, structurales et nutritionnelles propres à ces deux habitats (Bodenhausen *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2015). La transmission verticale peut également être considérée comme un processus de sélection de microorganismes par la plante mère pour sa descendance.

La sélection médiée par l'environnement comprend un large ensemble de facteurs biotiques et abiotiques. Cette notion de filtre environnemental a été largement démontrée, et de nombreuses études corroborent ainsi les célèbres propos du microbiologiste et botaniste Lourens Baas-Becking, traduits ici en français : « *Tout est partout, mais, l'environnement sélectionne* » (Baas-Becking, 1934; Wit & Bouvier, 2006). Parmi les facteurs environnementaux impliqués dans la sélection du microbiote de la plante, on peut notamment citer la température, le pH du sol (facteurs abiotiques) ou encore la présence d'insectes (facteur biotique) (Fitzpatrick *et al.*, 2020). Pour rendre la



chose un peu plus complexe, les facteurs environnementaux peuvent avoir un effet direct sur la structuration du microbiote ou un effet indirect par modification de la réponse de la plante à son microbiote. Les facteurs environnementaux influençant directement ou indirectement l'assemblage des communautés microbiennes seront également détaillés dans la suite de ce manuscrit.

### *ii. La dispersion*

La dispersion désigne la migration de microorganismes d'un habitat à un autre (Vellend, 2010). S'il est assez difficile de quantifier précisément les distances de dispersion des microorganismes, certains facteurs participent à ce phénomène comme le vent, les insectes ou les animaux. La transmission horizontale est ainsi considérée comme un moyen de dispersion que l'on peut qualifier de « passif », car par ce biais les microorganismes ne dépensent pas d'énergie (Nemergut *et al.*, 2013; Tesson *et al.*, 2015). Dans le cas d'une dispersion par mouvements d'air, la taille de l'individu semble être négativement corrélée à la distance de dispersion (Wilkinson *et al.*, 2012). Les bio-aérosols, ces particules en suspension dans l'air contenant des microorganismes, sont une voie majeure dans la dispersion des microorganismes aux parties aériennes des plantes (Vacher *et al.*, 2016). En plus de ces cas de dispersion passive, certaines bactéries sont douées de motilité grâce à leurs flagelles, et peuvent de ce fait se déplacer activement. De même, les champignons sont eux capable de développer leurs hyphes pour étendre leur zone d'activité. Ainsi, la dispersion participe à la dynamique des communautés microbiennes.

### *iii. La diversification*

En écologie des communautés, la diversification regroupe tous les processus par lesquels les membres du microbiote sont capables d'évoluer et de s'adapter. Un des moyens mis en œuvre par les bactéries pour évoluer et s'adapter à un environnement est leur capacité à transférer des gènes horizontalement. En effet, par des mécanismes moléculaires spécifiques, une bactérie peut recevoir des gènes provenant d'une autre cellule bactérienne (*i.e.* par conjugaison) (Lederberg & Tatum, 1946), ou de l'environnement (*i.e.* par transformation) et les intégrer à son génome par recombinaison homologue. En fonction de la nature des gènes reçus, une bactérie peut acquérir des fonctions supplémentaires qui lui permettront de s'adapter dans un nouvel environnement. De même certains taxons peuvent rapidement subir des mutations qui



leur permettront de s'adapter à un nouvel habitat, de répondre à un stress (Nemergut *et al.*, 2013) ou au contraire qui réduiront leur fitness. Les évènements de transferts horizontaux de gènes ne sont pas aléatoires et surviennent dans la plupart des cas à la suite de signaux que les bactéries reçoivent de leur environnement, ou grâce à une communication moléculaire active entre les membres de la communauté microbienne, appelée Quorum Sensing (Kaplan & Greenberg, 1985; Papke & Gogarten, 2012).

La diversification peut également être le fruit de plusieurs années de symbiose entre certains microorganismes et leur hôte : l'hôte évolue au cours du temps, et ses symbiotes s'adaptent à cette évolution pour conserver cette symbiose, c'est ce que l'on appelle la co-phylogénie (Kohl, 2020). Par exemple, la bactérie *Buchnera aphidicola* est un endosymbiote obligatoire du puceron qui se développe dans des cellules spécialisées de l'hôte. Le puceron et son symbiote ont co-évolué pendant des millions d'années (Baumann *et al.*, 1998), si bien qu'ils sont devenus co-dépendants : sans son symbiote, la fitness du puceron est affectée au point qu'il ne peut plus se reproduire, et sans son hôte, *Buchnera* est incapable de survivre car elle a perdu des gènes essentiels à son autonomie (Douglas, 1996). L'évolution du génome de *Buchnera* est telle qu'aujourd'hui elle ne ressemble certainement plus du tout à ce que cette bactérie était au moment d'entrer en symbiose avec le puceron. Chez la plante, très peu d'exemples existent mais l'on peut de nouveau citer la bactérie *Orrella dioscoreae* qui semble avoir co-évolué avec la liane *Dioscoreae* sp. la rendant presque impossible à cultiver sans son hôte (Pinto-Carbó *et al.*, 2018; De Meyer *et al.*, 2019).

#### *iv. La dérive écologique*

La dérive écologique est le processus d'évolution neutre permettant de réguler l'abondance relative des taxons au sein des communautés microbiennes. En effet, il s'agit du processus qui englobe tous les changements aléatoires menant à des modifications de l'abondance et de la diversité de la population microbienne, du fait par exemple de l'extinction d'un taxon dans la communauté. Ces évènements ne peuvent être expliqués par un des trois processus précédemment décrits et ne sont pas non plus liés à l'identité du taxon ou de l'hôte (Cordovez *et al.*, 2019). La dérive écologique est plus prononcée lorsque le microbiote est constitué de taxons en faible abondance, qui disparaîtront plus facilement. Par ailleurs, les évènements d'extinction aléatoire sont corrélés à une faible





sélection, c'est-à-dire que moins l'environnement et l'hôte sélectionnent spécifiquement le microbiote, plus il y a d'espèces vouées à disparaître aléatoirement de la communauté.

La dérive écologique ainsi que les formes passives de dispersion sont gouvernées par des processus neutres d'assemblage. En opposition au processus de niche qui tient compte de l'affinité contrastée des individus pour coloniser une niche, la théorie de la neutralité s'applique lorsque les membres d'une communauté ont des affinités similaires pour les ressources et donc pour coloniser une niche. Dans ce cas, le maintien ou non des membres de la communauté s'établit de manière totalement stochastique (Hubbell, 2001). L'assemblage du microbiote de la phyllosphère et de la graine est en parti gouverné par des processus neutres, notamment du fait de nombreux individus rares dans la communauté (Maignien *et al.*, 2014; Shade *et al.*, 2017; Rezki *et al.*, 2018).

Pour conclure, ces quatre processus écologiques regroupent bien l'ensemble des évènements qui participent à l'assemblage des communautés microbiennes : la dispersion et la diversification sont les processus par lesquels de nouveaux individus enrichissent un habitat, tandis que la sélection et la dérive écologique modifient l'abondance relative de ces individus au sein de l'habitat (Vellend, 2010). L'interaction de ces processus et le poids de chacun dans l'assemblage des communautés varie fortement d'un cas à l'autre.

#### v. *Les effets de priorité*

Lorsque des microorganismes investissent une nouvelle niche, que ce soit par dispersion ou diversification, leur ordre d'arrivée dans la communauté aura son importance s'ils ont la même fitness : c'est ce qu'on appelle les effets de priorité. En effet, l'ordre d'arrivée des taxons va déterminer leur devenir et leur compétitivité au sein de la niche, et influence fortement l'évolution des communautés microbiennes (Cordovez *et al.*, 2019; Fitzpatrick *et al.*, 2020). Les effets de priorité fonctionnent seulement dans le cas de processus neutres ou les individus sont équivalents, l'établissement du premier pouvant alors compromettre celui du second. Seul l'ordre d'arrivée régit ces assemblages, et il s'agit d'un évènement aléatoire. Il existe deux types d'effets de priorité : les effets de priorité inhibiteurs et les effets de priorité facilitateurs. Les effets de priorité inhibiteurs reposent sur le fait que l'arrivée de certains taxons dans la communauté va empêcher l'établissement de taxons secondaires, soit par préemption de niche soit par modification de niche (Fukami, 2015). La préemption de niche repose sur le fait que la consommation



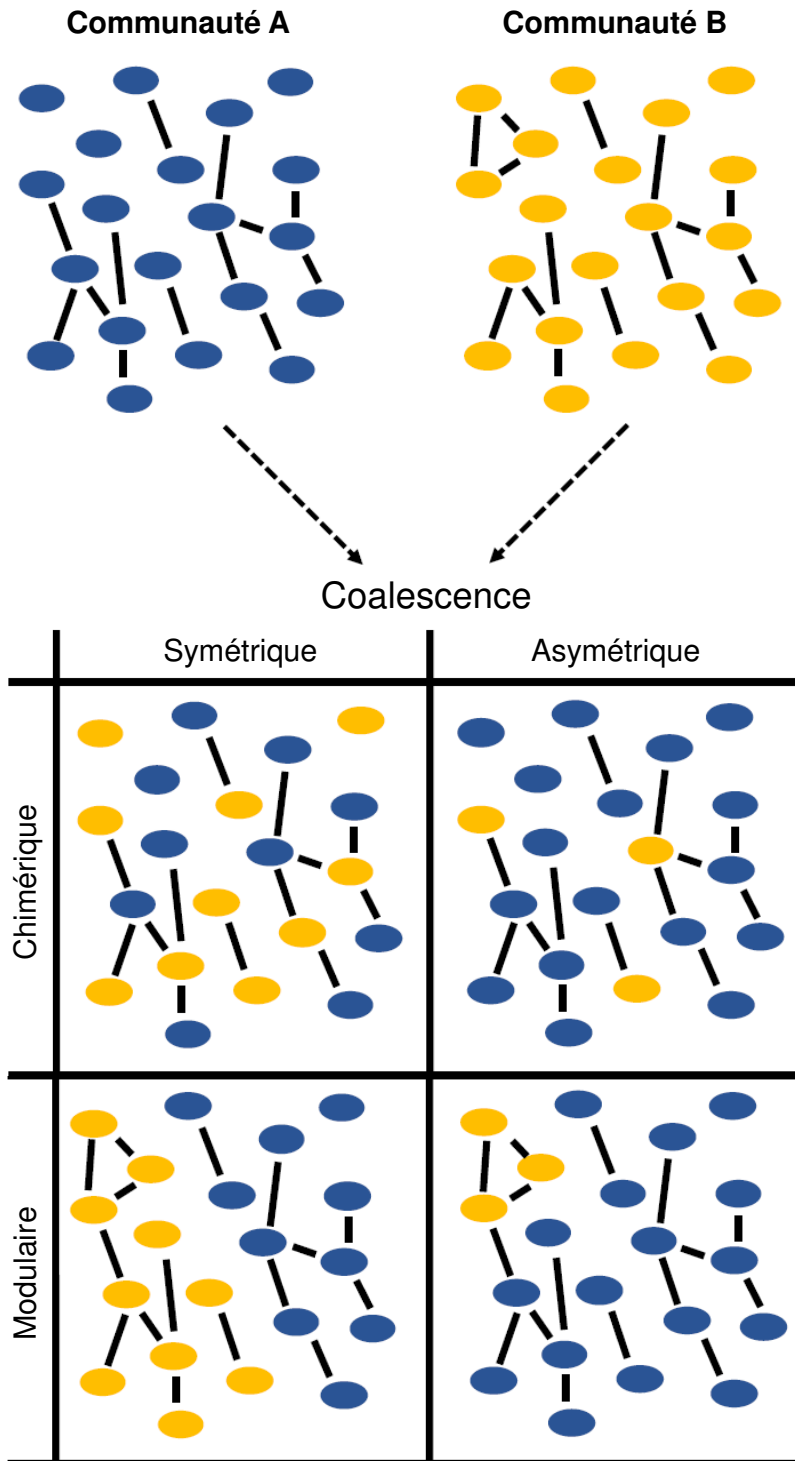
des ressources par les premières espèces arrivées limite leur disponibilité pour d'autres espèces. La préemption de niche limite donc le succès d'établissement d'espèces tardives qui nécessitent ces ressources pour survivre (Fukami, 2015). L'arrivée primaire de certains taxons peut également empêcher ou favoriser l'arrivée de taxons secondaires par modification de niche. Dans ce cas, les espèces arrivées en premier vont modifier la niche localement, de sorte à changer l'identité des espèces arrivées tardivement. Dans ce cas, la modification de niche est inhibitrice pour certains taxons et facilitatrice pour d'autres.

Ainsi, la présence primaire de certains individus va orienter l'assemblage des communautés, en facilitant l'établissement de symbiotes secondaires. Par exemple, Ridout *et al.* ont montré que la présence du champignon *Cladosporium* et de certaines bactéries en tant que symbiotes primaires des graines de blé (endophytes), ont des effets de priorité positifs qui facilitent l'établissement d'une symbiose secondaire entre la plante et le champignon mycorhizien *Phialocephala fortinii* (Ridout *et al.*, 2019). Etudier et comprendre les effets de priorité sur l'assemblage des communautés microbiennes associées aux plantes est d'un grand intérêt pour manipuler le microbiote et ainsi favoriser l'établissement d'espèces bénéfiques à la fitness de la plante au détriment d'espèces délétères (Toju *et al.*, 2018; Cordovez *et al.*, 2019).

### c. La coalescence des communautés

La coalescence des communautés correspond à la rencontre de deux (ou plusieurs) communautés initialement séparées. Cette notion récente a été introduite pour comprendre les processus écologiques qui se mettent en place et les facteurs façonnant cette rencontre entre communautés (Rillig *et al.*, 2015). En effet, la nature est remplie d'exemples dans lesquels des communautés microbiennes isolément établies se rencontrent, car les éléments de la nature sont continuellement déplacés : lorsque l'Homme ou l'animal se nourrissent, le microbiote de l'aliment rencontre alors le microbiote intestinal, ou lorsqu'une plante perd ses feuilles et que celles-ci tombent sur le sol, le microbiote de la feuille et du sol se rencontrent (Rillig *et al.*, 2015, 2016).

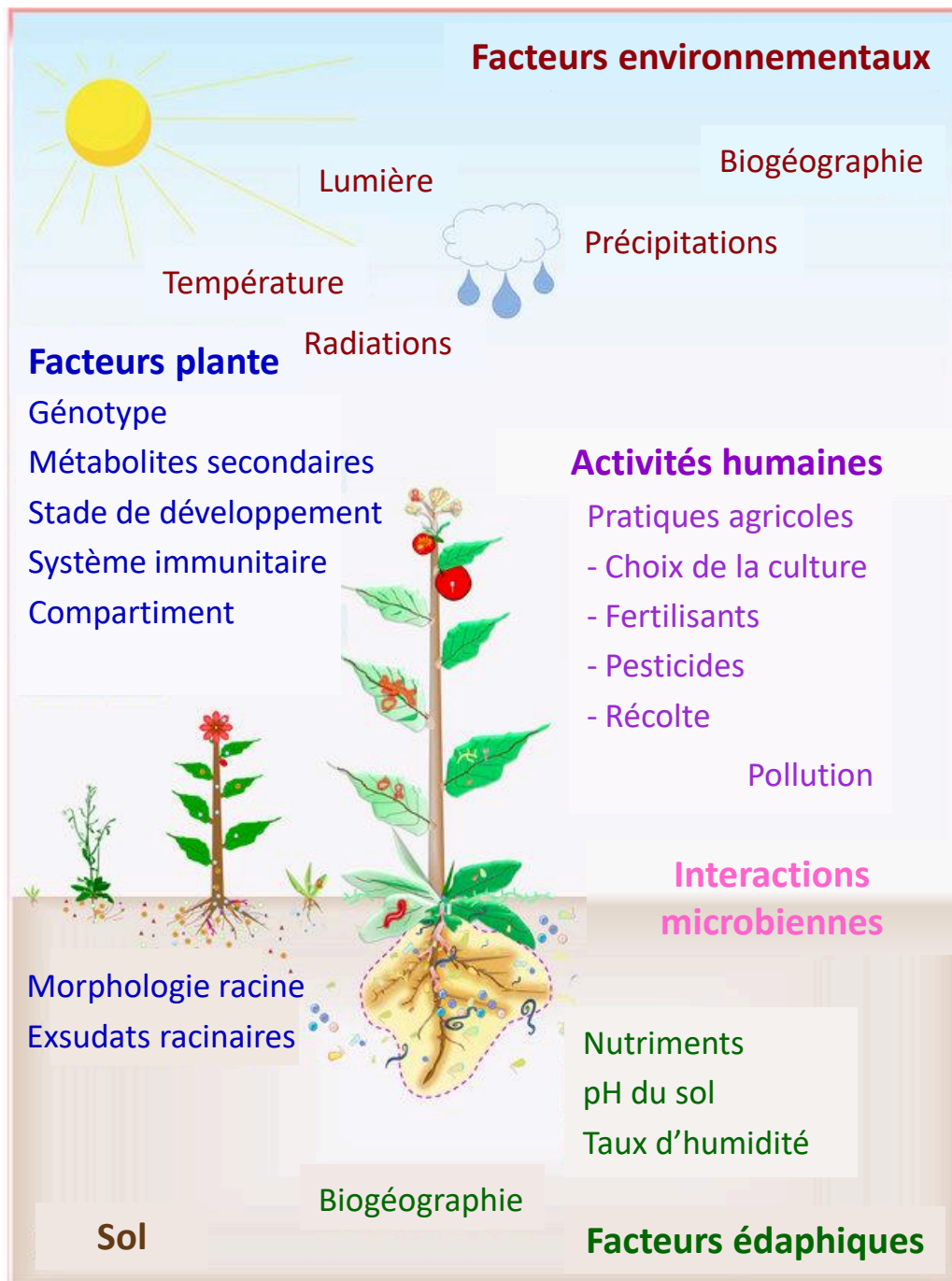
La coalescence peut être désignée comme symétrique dans le cas où les communautés fusionnent de manière équilibrée, ou asymétrique dans le cas où l'une prendra finalement le dessus sur l'autre (communauté dominante). La résultante dépendra du type d'interactions qui dominera entre les membres des deux communautés. Différents scénarios peuvent donc apparaître dans la « nouvelle » communauté : soit la



**Figure 12 : Différents types d'évènements de coalescence.** Les coalescences symétrique et asymétrique illustrent dans quelle mesure une communauté d'entrée domine la composition de la communauté créée. Les coalescences chimérique et modulaire se rapportent à l'étendue des nouvelles interactions entre des membres de chaque communauté d'entrée. Les évènements chimériques favorisent la formation de nouvelles interactions tandis que lors d'évènements modulaires, la communauté créée est basée sur des interactions préexistantes entre membres d'une même communauté de départ. Chaque point représente un taxon, et les lignes noires représentent les interactions entre taxons. Adapté de Castledine *et al.*, 2020.

coalescence a permis l'établissement de nouvelles interactions entre membres des deux communautés (coalescence chimérique), soit au contraire, très peu de nouvelles interactions surviennent et seules les interactions déjà établies dans chaque communauté séparée sont préservées (coalescence modulaire) (Castledine *et al.*, 2020) (Fig. 12).

La coalescence des communautés dépend de nombreux processus incluant effets de priorité, co-évolution, spécificités de niche, compétition et adaptation (Castledine *et al.*, 2020). Dans la majorité des cas, la coalescence a lieu lorsqu'une communauté microbienne migre dans un nouvel habitat déjà occupé par une communauté résidente. La communauté résidente est donc mieux adaptée à l'habitat dans lequel a lieu la rencontre, elle sait utiliser les ressources de son environnement et possède de ce fait un avantage considérable (effets de priorité) sur la communauté immigrante (De Meester *et al.*, 2016). Dans une telle situation, il est donc fréquent que la coalescence soit de nature asymétrique, et en faveur de la communauté résidente (Rocca *et al.*, 2020). Cependant, le succès d'invasion d'une communauté dépend également de la nature de son environnement de départ et de son environnement d'accueil. Ainsi, en médecine, on utilise la transplantation de microbiote fécal pour combattre certaines maladies associées à *Clostridium difficile*. Le microbiote fécal (immigrant) et le microbiote intestinal du receveur (résident) sont tous deux issus d'environnements humains et dans ce cas précis, le résident n'a donc pas forcément d'avantage compétitif sur l'immigrant. Une coalescence asymétrique dans le sens immigrant > résident est alors observée (Wang *et al.*, 2019b; Castledine *et al.*, 2020). Mais il est également possible que le microbiote intestinal du receveur soit mieux adapté à l'immunité de son hôte que le microbiote du donneur, et que ce dernier n'ait donc aucun avantage adaptatif (par analogie aux rejets de greffe). Par ailleurs, plus une communauté microbienne est diversifiée, plus elle a de chances de posséder des membres adaptés ou facilement adaptables au nouvel habitat et à ses ressources, et ainsi de dominer lors de la coalescence, par avantage compétitif (Tikhonov, 2016; Castledine *et al.*, 2020). D'autre part, certains microorganismes apportent de nouvelles fonctions qui favoriseront leur maintien dans la communauté résultante, si ces fonctions augmentent la productivité, la résistance à des stress ou la résilience de la communauté. A ce jour, cette théorie d'avantage compétitif dans la coalescence est la plus développée, mais d'autres interactions de type trophique ou mutualiste sont également impliquées dans ce processus (Castledine *et al.*, 2020).



**Figure 13 : Facteurs influençant la structure du microbiote des plantes.** Les facteurs environnementaux, sol et plante déterminent la composition et la structure du microbiote des plantes. Les interactions plante-microorganismes et microorganismes-microorganismes influencent également le microbiote des plantes. Adapté de Shelake *et al.*, 2019.

## 4. FACTEURS INFLUENÇANT LA STRUCTURE DU MICROBIOTE DES PLANTES

### a. Les facteurs environnementaux

Le microbiote des plantes est soumis à de nombreuses contraintes qui le façonnent et le font évoluer. Parmi ces contraintes, les facteurs environnementaux, qu'ils soient atmosphériques ou telluriques, expliquent une part très importante de la structuration du microbiote des plantes (**Fig. 13**).

#### i. Les facteurs édaphiques

Le sol constitue un réservoir riche et diversifié pour le microbiote de la plante et plus spécifiquement le microbiote racinaire et rhizosphérique. De plus, le sol est source de nutriments pour la plante, et cette disponibilité en nutriments est importante pour la croissance de la plante et donc la sélection de son microbiote. De ce fait, le sol est le facteur majeur influençant le microbiote des parties racinaires (Bulgarelli *et al.*, 2012). En fonction du type de sol, la composition et la diversité microbienne varie, en raison de facteurs abiotiques contrastés, comme le pH (Fierer & Jackson, 2006), le taux d'humidité, ou la structure physico-chimique du sol (Chiarini *et al.*, 1998; Garbeva *et al.*, 2004; Zarraonaindia *et al.*, 2015).

Bien que la composition microbienne et la nature du sol semble influencer principalement le microbiote des parties racinaires (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012; Peiffer *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2015), d'autres études ont mis en évidence que le sol influence également fortement la structure du microbiote des parties aériennes (Knief *et al.*, 2010; Zarraonaindia *et al.*, 2015). Cela peut être corrélé à la taille des plantes, car plus une plante est petite, plus ses parties aériennes sont proches du sol et peuvent être colonisées par le microbiote du sol, par exemple par éclaboussures lors d'intempéries (Bodenhausen *et al.*, 2013).

#### ii. Les contraintes climatiques et la localisation géographique

La plante est continuellement soumise aux variations environnementales que lui impose son milieu de vie. Ces principales variations sont la température, la luminosité, les précipitations, et les radiations. Le microbiote des parties aériennes de la plante varie ainsi fortement selon ces contraintes (Lindow & Brandl, 2003; Vorholt, 2012; Vacher *et al.*, 2016). Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence des variations de diversité et de composition du microbiote des plantes en fonction du changement de saison (Thompson





*et al.*, 1993), de la température (Coince *et al.*, 2014) ou selon l'altitude (Hashizume *et al.*, 2008; Cordier *et al.*, 2012). Le taux d'humidité d'un sol ou de la surface des feuilles est un facteur déterminant pour la composition du microbiote (Peiffer *et al.*, 2013). De même, la diversité microbienne de la surface des fruits augmente après un épisode de pluie (Allard *et al.*, 2020). Au cours de leur maturation, le taux d'humidité relative des graines diminue pour atteindre dans certains cas moins de 5%, pour s'y maintenir, les microorganismes doivent donc résister à la dessiccation (Leprince *et al.*, 2017).

Etant donné que les variations climatiques, l'altitude et le type de sol sont des facteurs influençant la structure du microbiote des plantes, il est évident que la localisation géographique des cultures a également son importance. Par exemple, une étude menée aux Etats-Unis sur des géotypes de maïs cultivés dans 5 champs situés dans différents états a montré un fort effet du lieu de culture sur la composition, la diversité et la richesse des communautés bactériennes du sol et de la rhizosphère (Peiffer *et al.*, 2013). De même chez le riz, la localisation géographique est un facteur important modifiant la structuration du microbiote de la racine et de la rhizosphère (Edwards *et al.*, 2015).

#### **b. Les facteurs anthropologiques**

Bien entendu, de nombreux facteurs liés à l'activité humaine ont un effet sur la structure et la diversité du microbiote des plantes. De nombreuses études ont montré l'impact des pratiques culturales et notamment du dosage de fertilisants et de pesticides sur la qualité des sols, de l'air et de l'eau et donc sur la structure du microbiote des plantes cultivées comme le maïs, le riz ou le soja (Ikeda *et al.*, 2011; Manching *et al.*, 2014; Edwards *et al.*, 2015; Bodenhausen *et al.*, 2019). Parmi les pratiques culturales qui ont un impact sur la structuration du microbiote, on peut également citer le labour profond du sol qui détruit les réseaux d'hyphes des champignons et perturbe la structure des communautés microbiennes du sol, et donc celle des plantes notamment au niveau racinaire et rhizosphérique (Tyler, 2019; Patanita *et al.*, 2020). Les rotations de culture favorisent un renouvellement des ressources et de la diversité microbienne du sol et peuvent limiter la propagation de maladies en empêchant le maintien de certains pathogènes d'une année sur l'autre, comme c'est le cas pour la rotation blé-colza (Hilton *et al.*, 2018; Kerdraon *et al.*, 2019).



De plus, certaines plantes sont cultivées depuis des milliers d'années et ont de ce fait subi un processus d'évolution différent des plantes sauvages, appelé domestication (Meyer & Purugganan, 2013). Les variétés cultivables sont sélectionnées sur la base de leurs traits phénotypiques et génotypiques comme la taille des plantes, le nombre de fleurs et de graines produites, l'expression de gènes de résistance à des maladies. La domestication et la sélection variétale de centaines de plantes cultivées (riz, blé, orge, maïs, tournesol, haricot, tomate) ont modifié leur rapport à la nature et ont impacté la structure de leur microbiote (Bulgarelli *et al.*, 2015; Shenton *et al.*, 2016; Leff *et al.*, 2017; Pérez-Jaramillo *et al.*, 2017; Alonso *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020). S'il existe une influence du génotype de l'hôte sur la composition de son microbiote, alors il est légitime de penser qu'en sélectionnant une variété, on sélectionne un microbiote particulier. Réduire la diversité génétique des variétés cultivées induirait une réduction de la diversité des communautés microbiennes associées.

### **c. Les facteurs « plante »**

L'impact du génotype de l'hôte et du stade de développement de la plante sont deux facteurs importants dans la structuration du microbiote. D'une espèce de plante à l'autre, le microbiote diffère fortement, mais plus spécifiquement à l'échelle du génotype, les caractéristiques morphologiques de la plante, son système immunitaire, sa production de métabolites et sa composition en exsudats racinaires diffèrent, ce qui impacte également l'assemblage et la composition du microbiote (Cordovez *et al.*, 2019; Shelake *et al.*, 2019). De plus, au cours de son développement, les différents organes de la plante grandissent et évoluent, les membres du microbiote se succèdent alors et la population microbienne évolue avec l'âge de la plante.

#### *i. Facteurs génétiques et phyllosymbiose*

Beaucoup de chercheurs se sont interrogés sur l'influence potentielle de l'espèce et du génotype sur la structure du microbiote des plantes. Ainsi, l'effet de la variation génétique de l'hôte sur la composition de son microbiote a été observé chez diverses espèces de plantes. Par exemple, une étude comparant le microbiote de 30 espèces d'angiospermes a révélé de fortes variations de composition (65% de variation des phylum) et de diversité des communautés bactériennes de l'endosphère racinaire, corrélées à la phylogénie des espèces. L'espèce de plante expliquait 40% de la variance observée dans les assemblages endosphériques bactériens (Fitzpatrick *et al.*, 2018). Chez



la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, un effet moindre (<1% de la variance) mais significatif du génotype a été reporté sur la composition bactérienne et fongique de l'endosphère racinaire (Lundberg *et al.*, 2012; Urbina *et al.*, 2018) mais également sur la composition du microbiote des feuilles (Horton *et al.*, 2014). De même, chez la moutarde sauvage, le microbiote de la phyllosphère est influencé par le génotype de l'hôte et cet effet varie en fonction de l'année et du site de culture (Wagner *et al.*, 2016). Dans toutes ces études, l'effet du génotype était relativement faible, mais concernait des variations d'abondance relative de certains taxons spécifiques. Plusieurs autres études ont fait des observations similaires où l'effet génotype était significatif mais faible, dans la rhizosphère chez le maïs (Bouffaud *et al.*, 2012; Peiffer *et al.*, 2013), le haricot (Pérez-Jaramillo *et al.*, 2017) et le riz (Edwards *et al.*, 2015).

Comme on peut le constater, la majorité des études qui se sont penchées sur l'effet des variations génétiques de l'hôte se sont principalement intéressées aux parties racinaires et rhizosphériques. Cependant, cet effet a également été démontré sur graines, où environ 20% des taxons bactériens endophytes sont spécifiques à un seul génotype de riz ( $n = 5$ ) bien qu'il ne s'agisse pas des plus abondants de la communauté (Zhang *et al.*, 2019). De même, malgré des communautés dominées par les mêmes taxons, des variations dans la composition et l'abondance relative des communautés bactériennes ont été mises en évidence entre génotypes ( $n = 4$ ) chez le tabac (Chen *et al.*, 2020). Par contre, dans ces études, aucun effet du génotype sur la richesse et la diversité des communautés bactériennes n'a été détecté.

Ici, les exemples choisis présentent principalement des différences génotypiques au sein d'une même espèce de plante, et l'on voit déjà qu'à ce niveau, des effets sur la structure du microbiote sont mis en évidence. Et plus les espèces de plantes seront phylogénétiquement éloignées (divergence évolutive), plus elles présenteront des patrons de sélection différents de leur microbiote (Mazel *et al.*, 2018). Le microbiote évolue ainsi à mesure que son hôte évolue : c'est ce que l'on appelle la phyllosymbiose (Brooks *et al.*, 2016; Kohl, 2020).

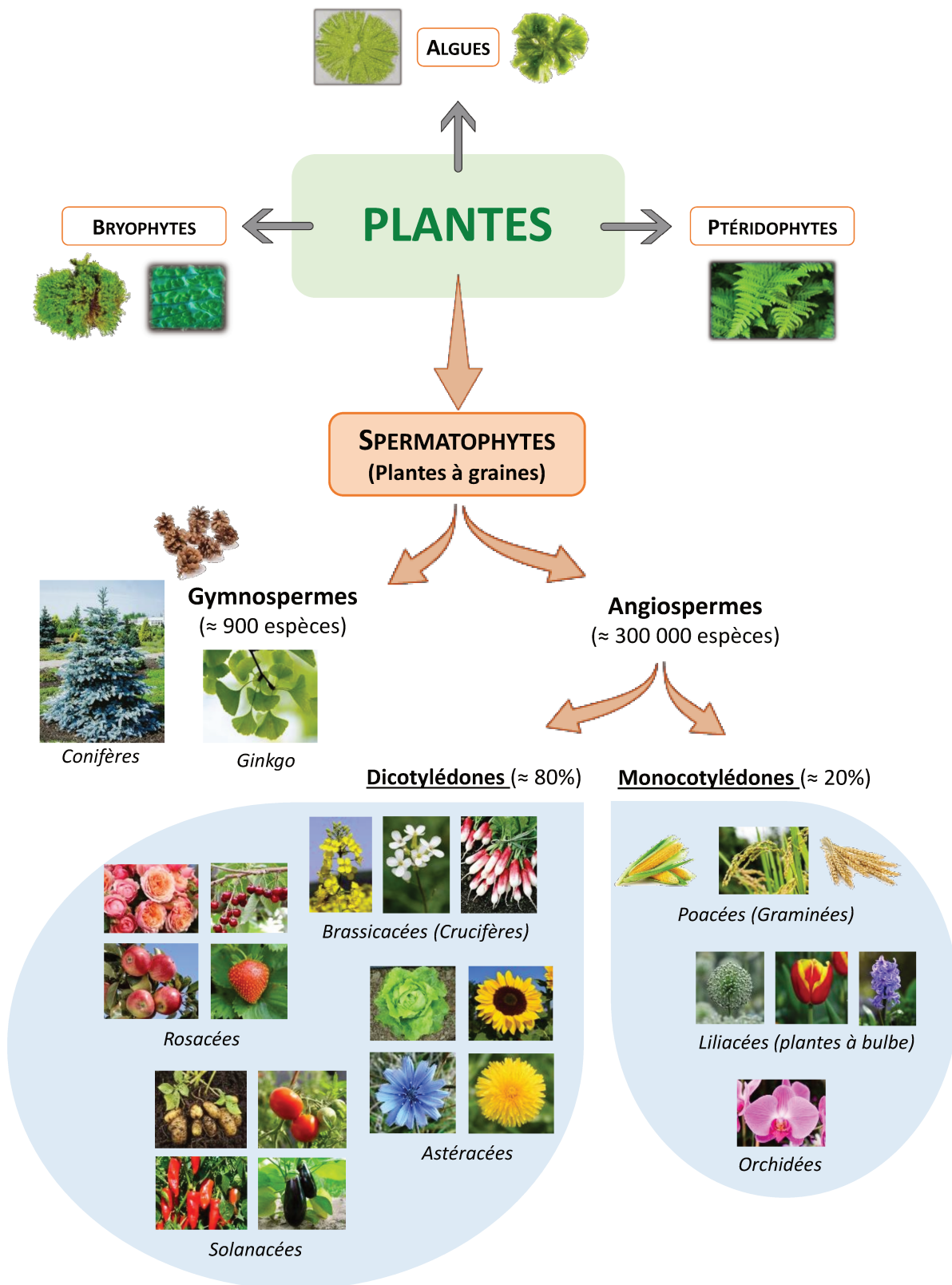
## *ii. Le stade de développement*

Au cours de son cycle de vie, la plante va développer son système racinaire, allonger ses tiges, et former de nouveaux organes comme les fleurs et les fruits. Ainsi, une étude menée sur trois espèces de plantes (pois, blé et canne à sucre) a montré que les



communautés microbiennes associées à la rhizosphère variaient en fonction du stade de développement de la plante, avec notamment une transition importante entre les stades de développement précoces végétatifs (plantule, rosette) et les stades reproducteurs (floraison, fructification, sénescence) (Houlden *et al.*, 2008). D'autres études effectuées sur la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana* ont montré que la plante ne sélectionne pas les mêmes microorganismes aux stades précoces (plantule, végétatif) et aux stades reproducteurs (bourgeonnement, floraison), avec une richesse bactérienne plus élevée au stade végétatif (Micallef *et al.*, 2009; Chaparro *et al.*, 2014). En effet, au cours de son développement, les exsudats produits par la plante changent de composition et de concentration, favorisant la croissance de certains microorganismes possédant les gènes impliqués dans le métabolisme de certains exsudats. Par exemple chez *A. thaliana*, une corrélation entre la quantité d'acides aminés sécrétée par les racines au cours du temps (7-28 jours), et l'augmentation d'expression des gènes microbiens impliqués dans le métabolisme des acides aminés a été mise en évidence (Chaparro *et al.*, 2013). Par ailleurs, De Campos et son équipe ont observé des différences d'abondance relative des communautés bactériennes endophytes des racines chez le colza entre les stades rosette et floraison. Ces fluctuations de l'abondance relative pouvaient être observées à différentes échelles taxonomiques allant du phylum au genre (de Campos *et al.*, 2013).

Enfin, tous ces exemples démontrent que la structure et la diversité du microbiote de la plante dépendent de nombreux facteurs temporels, génétiques et environnementaux. Et une fois de plus ces facteurs sont interdépendants, car l'effet de l'hôte sur son microbiote varie selon l'environnement et selon l'habitat étudié (Fitzpatrick *et al.*, 2020). Afin de déterminer les facteurs influençant les processus écologiques impliqués dans l'assemblage des communautés microbiennes des plantes, il est donc indispensable d'éviter de cumuler les facteurs confondants et de bien intégrer et tenir compte de la variabilité due à l'environnement. Finalement, il faut garder en tête que l'objectif de toutes ces études est de donner des pistes pour identifier de nouveaux leviers d'action qui promeuvent la santé et la croissance des plantes.



**Figure 14 : Organisation des Spermatophytes et importance des Angiospermes dans le règne végétal.** Pour chaque sous embranchement des Spermatophytes, quelques exemples ont été illustrés. Les Poacées, Liliacées et Orchidées sont des familles de Monocotylédones. Les Rosacées, Brassicacées, Astéracées et Solanacées sont des familles de Dicotylédones.



## B. LA GRAINE

### 1. LES PLANTES A GRAINES

Les plantes à graine, appelées Spermatophytes sont séparées en deux sous-embranchements : les Gymnospermes et les Angiospermes (**Fig. 14**). La différence entre ces embranchements réside dans le fait que dans un cas, le gamète femelle (l'ovule) n'est pas protégé dans un ovaire (il est « nu »), c'est le cas des conifères et des ginkgos, tandis que dans l'autre, l'ovule est protégé par un organe spécialisé (le fruit).

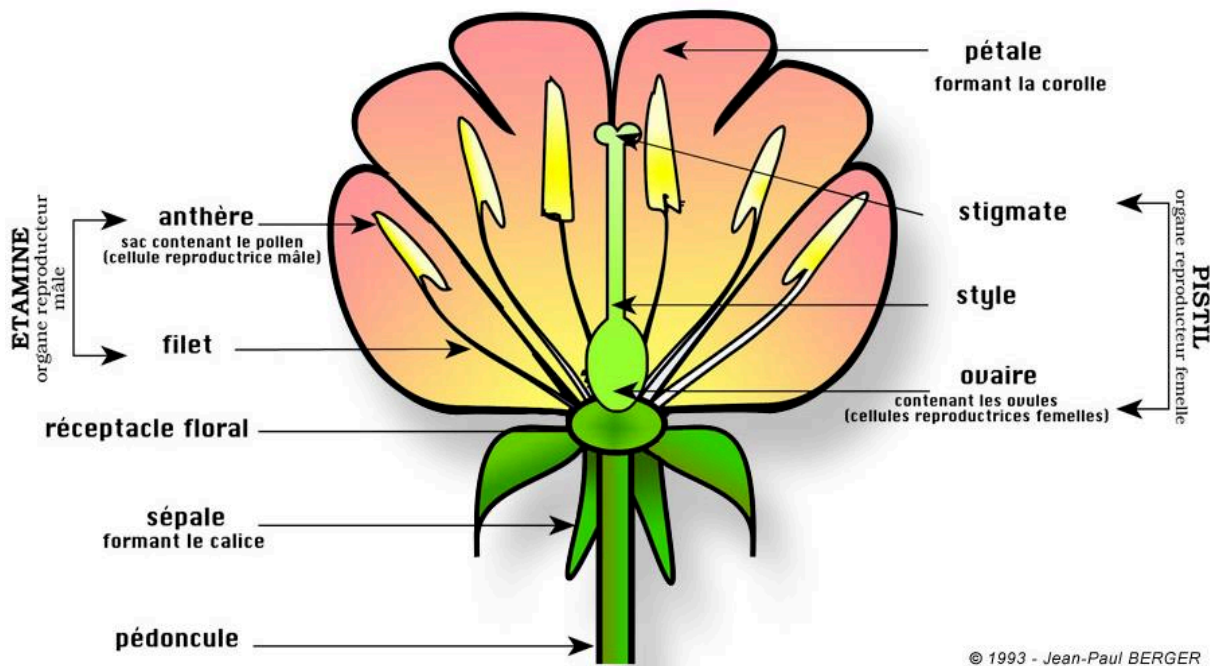
La grande majorité des plantes ( $\approx 300\ 000$  espèces) sont des Angiospermes pour lesquels la graine est l'organe de dissémination et de survie de la plante. C'est elle qui assure le maintien de la plante au cours des générations.

### 2. FORMATION ET MORPHOLOGIE DE LA GRAINE CHEZ LES BRASSICACEES

#### a. La pollinisation

Une fois montée à fleurs, la plante est prête à se reproduire. Pour cela, les grains de pollen contenus dans les anthères doivent être positionnés sur le stigmate, à la suite de quoi ils germeront pour former un tube pollinique. Ce dernier pourra pénétrer dans le pistil de la fleur, migrer à travers le style jusqu'à l'ovaire et atteindre l'ovule afin de le féconder (Proctor & Yeo, 1973) (**Fig. 15**). La pollinisation est donc définie comme l'étape durant laquelle un grain de pollen sera déposé sur un stigmate.

Il existe plusieurs moyens pour la plante d'assurer sa pollinisation. Le principal mode de pollinisation est celui assuré par les insectes pollinisateurs puisqu'on estime qu'entre 78% et 94% des espèces Angiospermes sont pollinisées par des insectes (Ollerton *et al.*, 2011). Lorsque les insectes visitent les fleurs, ils se frottent aux anthères remplies de pollen et transportent ainsi avec eux des centaines de grains qu'ils disséminent sur d'autres fleurs. Les pollinisateurs les plus répandus sont les abeilles et les bourdons, qui se nourrissent du nectar des fleurs et l'exploitent pour produire du miel, et dont les larves se nourrissent également de pollen (Dobson & Peng, 1997). Mais de nombreux autres insectes visitent les fleurs : les mouches, les scarabées, les papillons, les guêpes, les fourmis sont autant d'espèces d'insectes favorisant la pollinisation (Rader *et al.*, 2020). Par ailleurs, certaines espèces d'oiseaux comme le colibri, ou encore certaines chauves-souris se nourrissent dans les fleurs et participent également à la pollinisation.



**Figure 15 : Morphologie schématique de la fleur chez les Angiospermes.** Le pistil est composé du stigmate, du style et des ovaires (contenant les ovules) et constitue l'organe de reproduction femelle. L'étamine est composée d'une anthère (contenant le pollen) et d'un filet et constitue l'organe de reproduction mâle. D'après Berger, 1993 ([www.jpj-imagine.com/](http://www.jpj-imagine.com/)).

Enfin, les grains de pollen peuvent aussi être transportés par le vent ou la pluie (Fan *et al.*, 2012). En plus d'assurer la pollinisation, la visite des fleurs par les insectes et autres animaux participe à l'assemblage et à la diversité du microbiote des fleurs (Alekklett *et al.*, 2014; Ushio *et al.*, 2015). Ainsi, les communautés fongiques associées aux fleurs de figuier et à leurs fourmis pollinisatrices sont similaires et dominées par les mêmes taxons après pollinisation (Martinson *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'absence de pollinisateurs diminue d'environ 50% la variabilité des communautés microbiennes entre fleurs de pommier (Allard *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces moyens de dissémination du pollen de fleurs en fleurs favorise les croisements entre plantes d'une même espèce. Ainsi, lorsque le pollen d'une plante féconde l'ovule d'une autre plante de la même espèce, on parle de fécondation croisée, ou allogamie. La grande majorité des plantes à fleurs sont principalement allogames c'est-à-dire qu'au sein d'une même espèce, toutes les plantes peuvent se féconder les unes les autres. L'allogamie favorise le brassage génétique entre individus et permet d'expliquer dans certains cas l'histoire évolutive des espèces de plantes à fleurs. D'autre part, il arrive aussi que le pollen d'une fleur germe et pénètre dans le pistil de cette même fleur, ou d'autres fleurs de la même plante. Si l'autopollinisation de ces fleurs est un succès, on parle alors de plantes autogames, douées d'autofécondation. Cependant, bien que toutes les plantes possédant les organes mâle et femelle (hermaphrodites) soient potentiellement douée d'autogamie, ce mode de fécondation reste minoritaire et les plantes privilégient souvent l'allogamie comme mode de fécondation principal (**Tableau 1**).

#### **b. Fécondation et formation de la graine**

Une fois la fleur pollinisée, le tube pollinique du grain de pollen pénètre dans un ovule pour y effectuer une double fécondation. En effet, deux gamètes mâles sont relâchés par le tube pollinique dans l'ovule. L'un d'eux fusionnera avec un noyau du sac embryonnaire (l'oosphère) pour former l'embryon, tandis que le second fusionnera avec deux noyaux polaires pour former l'albumen (ou endosperme), qui servira par la suite de tissu de réserve pour l'embryon en développement (Sprunck, 2020). Chez les Brassicacées, le fruit est une silique renfermant plusieurs graines (ovules fécondés). A l'intérieur des siliques, les graines peuvent alors se développer. Tout d'abord, l'albumen va rapidement se diviser en plusieurs cellules pour s'étendre autour de l'embryon.

Tableau 1 : Mode de fécondation chez quelques plantes cultivées.

Inspiré de <http://www.leblogadupdup.org/2020/01/>

	Autogame (=autofécondation)	Allogame (= fécondation croisée)
<b>Liliacées</b>		
Oignon		X
Poireau		X
<b>Astéracées</b>		
Chicorée		X
Laitue	X	
<b>Brassicacées</b>		
Chou-fleur		X
Rutabaga		X
Navet	X	X
Radis		X
Colza	X	X
<b>Fabacées</b>		
Haricot	X	X
Pois	X	
Fève	X	X
<b>Solanacées</b>		
Tomate	X	
Poivron	X	X
Aubergine	X	X
<b>Cucurbitacées</b>		
Concombre		X
Courgette		X
<b>Poacées</b>		
Blé	X	
Maïs		X

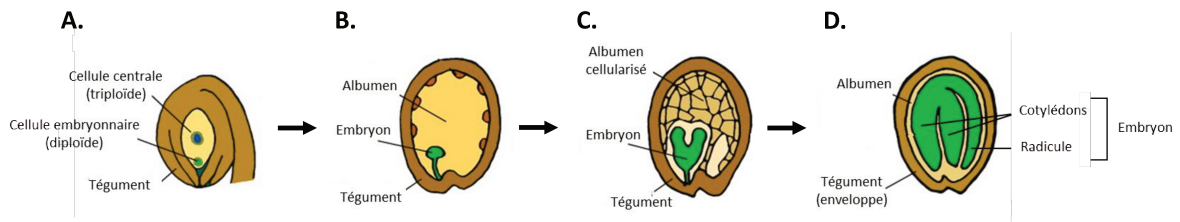
L'embryon va ensuite se développer et prendre tout l'espace, au détriment de l'albumen. On parle de graines exalbuminées. A maturité, les graines contiennent un embryon développé et un albumen très fin, le tout entouré d'un tégument (Sun *et al.*, 2010) (**Fig. 16**).

Chez les Angiospermes, en plus des graines exalbuminées caractéristiques des Brassicacées et des Fabacées, il existe deux autres catégories de graines : les graines albuminées et les graines à périsperme (**Fig. 17**). L'albumen des graines albuminées est très développé et sert de tissu de réserve pour la graine, tandis que l'embryon est mince. Ces graines sont caractéristiques des Poacées comme le blé ou le riz, et chez ces espèces, elles sont individuellement enfermées dans un fruit sec indéhiscent appelé caryopse. Enfin, la troisième catégorie de graines concerne les graines à périsperme. Cette fois-ci, ce n'est ni l'embryon, ni l'albumen qui se développent, mais le nucelle, également appelé périsperme, qui est le tissu diploïde constituant l'intérieur de l'ovule. C'est le cas des graines de poivre ou d'amarantes (Kleiman, 2001).

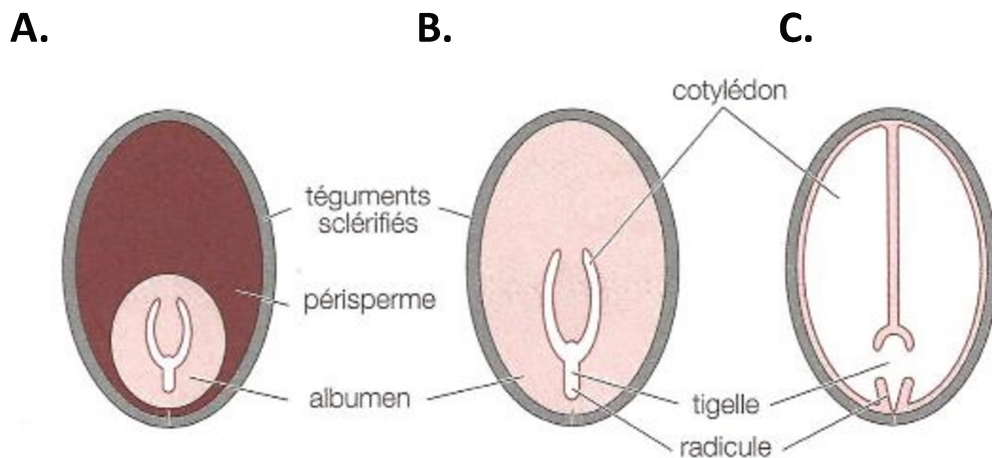
### 3. LE MICROBIOTE DE LA GRAINE

#### a. Méthodologie

Avant d'entrer dans le vif du sujet et de décrire la diversité et la composition du microbiote de la graine, il est important de comprendre techniquement, comment on extrait le microbiote de la graine afin de l'étudier. Comme je l'ai déjà précisé, le microbiote de la graine se situe tant à l'intérieur des tissus (endophytes) de la graine qu'en surface (épiphytes) de celle-ci. Pour extraire l'ADN du microbiote d'échantillons environnementaux comme le sol, les racines ou les feuilles, de nombreux kits d'extraction d'ADN spécifiques ont été commercialisés, et la préparation des échantillons consiste le plus souvent à sécher et broyer mécaniquement les tissus avant d'utiliser ces kits. Cette procédure ne convient pas aux échantillons de graines car l'enveloppe est résistante aux broyeurs à billes. Le broyage doit donc être réalisé au pilon-mortier dans une solution saline pour détruire le tégument (Johnston-Monje & Raizada, 2011; Rybakova *et al.*, 2017; Adam *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020). Cependant de nombreux composés antimicrobiens stockés dans les tissus de la graine (Terras *et al.*, 1995) peuvent être relargués lors du broyage. Ces composés vont impacter la composition du microbiote des graines (Shade *et al.*, 2017).



**Figure 16 : Développement de la graine chez *Arabidopsis thaliana* (Brassicacée).** (A) Avant fécondation, l'ovule enfermé dans le tégument maternel contient une cellule œuf haploïde et une cellule centrale diploïde. Après une double fécondation, la cellule œuf fécondée devient l'embryon (diploïde) et la cellule centrale se développe pour former l'albumen (triploïde). (B) Le tégument maternel devient l'enveloppe de la graine. L'albumen se développe rapidement pour former une large cellule polynucléée avant que l'embryon ne se développe. (C) L'albumen se cellularise et l'embryon commence à se développer. (D) L'embryon grandit jusqu'à remplir la cavité au détriment de l'albumen. A maturité, la graine contient une fine couche d'albumen et un embryon très développé, le tout entouré d'une enveloppe (le tégument). Adapté de Sun *et al.*, 2010.



**Figure 17 : Les différents types de graines.** (A) Graine à périsperme. (B) Graine albuminée. (C) Graine exalbuminée. D'après Kleiman, 2001.

Une seconde méthode consiste donc à éviter l'étape de broyage des graines. Cette méthode est classiquement employée en épidémiologie des semences par l'Association Internationale de Tests sur Graines (ISTA - <https://www.seedtest.org/en/home.html>), pour détecter la présence d'agents phytopathogènes au sein de lots de semences. Elle consiste à plonger les graines dans un tampon phosphate salin (PBS) additionné (ou non) de Tween 20 en faible concentration (0,05%), un tensioactif favorisant la solubilisation des membranes et la mise en suspension des microorganismes. Après agitation dans cette solution, les graines sont imbibées et cela permet de récupérer dans le surnageant le maximum de cellules et d'ADN microbien (Barret *et al.*, 2015; Klaedtke *et al.*, 2016; Torres-Cortés *et al.*, 2018; Rezki *et al.*, 2018). La durée et le volume de macération dépend de l'espèce végétale ciblée. Afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel génétique, l'extraction est effectuée sur des lots de 1000 grains. Cette taille d'échantillon permet de limiter les variations de taille de populations microbiennes associées aux graines (Gitaitis & Walcott, 2007).

Comme je l'ai déjà mentionné, la plupart des études de diversité du microbiote de la graine s'intéressent principalement à la composante endophytique de ces communautés. Pourtant, les graines sont semées avec leurs endophytes et leurs épiphytes, ces derniers peuvent donc se développer dans la spermosphère pendant la germination puis coloniser la plante. Dans les travaux effectués au cours de cette thèse, le microbiote de la graine sera systématiquement considéré comme étant l'ensemble des communautés bactériennes et fongiques endophytes et épiphytes, sans distinction.

#### **b. Assemblage et transmission du microbiote de la graine**

De nombreuses études ont mis en évidence la transmission de microorganismes phytopathogènes à et par la graine (Singh & Mathur, 2004). De ce fait, la graine a longtemps été considérée uniquement comme un vecteur de maladies pour la plante. Pourtant, des microorganismes commensaux et même bénéfiques pour la plante sont également transmis à et par la graine (Shade *et al.*, 2017). L'origine des microorganismes et la voie par laquelle ils sont transmis à la graine vont déterminer leur localisation sur/dans la graine. Il existe trois principales voies de transmission des microorganismes à la graine : transmission interne à travers le système vasculaire de la plante, transmission par voie florale à travers le stigmate et transmission par voie externe par contact direct des graines avec d'autres organes de la plante (Maude, 1996). L'importance relative de





chacune de ces voies dans l'assemblage du microbiote de la graine dépend fortement de la structure physique de la plante, et notamment de la fleur, du fruit et de la graine.

*i. Transmission par voie interne*

La transmission interne par le xylème est considérée comme la voie majoritaire qu'empruntent les agents pathogènes et les endophytes de la plante pour assurer leur transmission verticale (Truyens *et al.*, 2015). Cette voie de transmission spécifique n'est possible que pour les microorganismes capables d'éviter les défenses de l'hôte. Plusieurs études se sont intéressées à la transmission interne de microorganismes pathogènes à la graine. Par exemple, deux bactéries phytopathogènes responsables de la gousse commune du haricot, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* et *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* sont transmises par voie systémique aux graines de haricot sensibles (Darsonval *et al.*, 2008, 2009; Darrasse *et al.*, 2018). *X. citri* pv. *fuscans* peut être transmise, même à des concentrations faibles sur graine (de l'ordre de 400 UFC par graine), de générations en générations *via* la graine sans provoquer de symptômes. L'agent pathogène peut résider sur/dans la graine en faible abondance et de manière asymptomatique, puis proliférer et entamer un cycle infectieux lorsque les conditions deviennent favorables (Darrasse *et al.*, 2007). Chez la carotte, la bactérie phytopathogène 'Candidatus *Liberibacter solanacea*' est également transmise dans les graines par le phloème de la plante (Bertolini *et al.*, 2015).

Des bactéries endophytes non pathogènes ont été observées par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) dans les ovaires de vigne et dans les graines (Compant *et al.*, 2011). Par ailleurs, les champignons endophytes du genre *Epichloë* sont connus pour être essentiellement transmis verticalement par la graine (Saikkonen *et al.*, 2002). Ils se développent presque exclusivement de manière asexuée et n'accomplissent jamais leur phase sexuée pour disséminer horizontalement. Par exemple, la croissance et l'évolution de la souche *Epichloë festucae* Fl1 a été suivie par microscopie confocale à travers le cycle de croissance de l'ivraie (Poacées). Le champignon est présent dans les tiges et à l'apex de la plante, il atteint facilement le pistil de la fleur dans lequel il étend ses hyphes jusqu'à l'ovule puis envahit l'embryon et la graine toute entière, d'où il est transmis à la plantule (Liu *et al.*, 2017).



*ii. Transmission par voie florale*

La fleur abrite un microbiote spécifique et diversifié (Alekkett *et al.*, 2014). Les microorganismes associés à la fleur peuvent ainsi constituer un réservoir pour l'assemblage du microbiote de la graine (Shade *et al.*, 2013). La fleur étant un organe éphémère, les microorganismes doivent être présents au moment de la floraison pour être transmis par cette voie. La transmission de microorganismes à la graine par voie florale peut avoir lieu à des stades précoces du développement de la graine, à condition que ces microorganismes parviennent à atteindre la graine *via* le stigmate de la fleur. Cette voie de transmission peut potentiellement favoriser le passage d'endophytes à l'intérieur de la graine en formation. Par exemple, la présence simultanée de la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora* et de la bactérie endophyte *Pantoea agglomerans* a été détectée par fluorescence le long des styles et sur le stigmate des fleurs de pommiers et de poiriers (Spinelli *et al.*, 2005). Dans cet exemple, *P. agglomerans* est antagoniste de *E. amylovora* et prolifère dans les organes de la fleur pour réduire l'incidence du pathogène. *P. agglomerans* étant une bactérie fréquemment retrouvée associée aux graines, sa présence sur les stigmates de la fleur présage qu'il peut s'agir de sa voie de transmission pour atteindre la graine.

Certains microorganismes pathogènes peuvent être transmis par voie florale aux graines d'une plante non-hôte. Ainsi, la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, pathogène des Brassicacées est transmise à la graine de haricot (Fabacée). Le haricot insensible à cette bactérie ne déclenche pas de système de défense, permettant ainsi sa transmission à la plantule. Le pathogène est alors saprophyte de la graine de haricot. Le haricot deviendrait ainsi vecteur de ce pathogène jusqu'à sa transmission horizontale à une plante-hôte (Darrasse *et al.*, 2010). Par ailleurs, plusieurs études ont révélé que des microorganismes bénéfiques présents sur la fleur étaient effectivement retrouvés dans la graine. Par exemple, la souche *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN (Sessitsch *et al.*, 2005), une bactérie promotrice de croissance chez une large gamme d'hôtes (Mitter *et al.*, 2013), est retrouvée dans l'embryon de la graine de maïs, soja et poivron après pulvérisation des fleurs avec une suspension bactérienne (Mitter *et al.*, 2017).



### *iii. Transmission par voie externe*

La colonisation tardive de la graine mature est assurée par voie externe. Contrairement aux voies de transmission interne et florale, la transmission par voie externe est considérée comme la voie majoritaire pour l'assemblage du microbiote épiphyte de la graine. Le champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola*, responsable de la maladie de la tache noire chez les Brassicacées, traverse les siliques (fruits) par les jonctions cellulaires puis envahit la surface et le tégument de la graine (Pochon *et al.*, 2012). Pour être transmis aux graines, le pathogène produit des osmosenseurs et des antioxydants qui le protègent des stress osmotiques et oxydatifs induits par les défenses de la plante (Pochon *et al.*, 2012; Calmes *et al.*, 2013).

Un autre aspect de la transmission par voie externe concerne les contaminations extérieures. En effet, une fois les graines à maturité, les fruits ou siliques vont sécher et libérer les graines. Celles-ci pourront alors se disperser et entrer en contact externe avec les microorganismes présents sur les fruits et dans leur environnement direct. Par ailleurs, chez les plantes cultivées, la récupération des graines par battage est également source de contaminations pour la surface tégumentaire. Cette voie de transmission du microbiote à la graine étant plus permissive, il est généralement proposé que la surface des graines est habitée par une diversité de microorganismes supérieure à celle de l'intérieur des graines (Barret *et al.*, 2016).

#### **c. Diversité, composition et variation du microbiote de la graine**

##### *i. Richesse et diversité du microbiote*

En comparaison avec d'autres habitats de la plante, le microbiote de la graine est en moyenne moins diversifié que le microbiote de la rhizosphère et de la phyllosphère, bien que le fait de travailler à partir de lots de graines maximise la diversité microbienne de cet habitat (Compant *et al.*, 2011; Vorholt, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2013; Links *et al.*, 2014; Barret *et al.*, 2015; Cope-Selby *et al.*, 2017). Pendant de nombreuses années, les analyses du microbiote de la graine, et notamment des endophytes étaient effectuées par des méthodes exclusivement culture-dépendantes, ne permettant pas d'appréhender la réelle richesse et diversité de ce compartiment. Depuis, une étude a comparé la richesse bactérienne épiphyte des graines de blé et de Brassicacées, obtenue par des méthodes culture-dépendantes et culture-indépendantes. La concentration était de  $10^6$  à  $10^8$



génomés bactériens par gramme de graines, tandis que la part cultivable atteignait seulement  $10^5$ – $10^6$  UFC par gramme (Links *et al.*, 2014). Lorsqu'il s'agit de l'étude des endophytes, le bilan est encore plus faible puisqu'en moyenne seulement  $10^2$  UFC par gramme de graines sont cultivables (Förnkrantz *et al.*, 2012).

La richesse d'un lot de semence est généralement située entre 10 et 1000 OTU bactériennes et entre 5 et 100 OTU fongiques. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette variation comme la taille des graines, le type de marqueur moléculaire utilisé et les analyses effectuées (Links *et al.*, 2014; Barret *et al.*, 2015, 2016). Étant donnée la diversité microbienne parfois très faible retrouvée dans les graines en comparaison avec d'autres habitats de la plante, d'aucuns proposent que la graine agit comme un goulot d'étranglement qui sélectionne le microbiote transmis à la plantule. De cette manière les quelques taxons sélectionnés gagneraient un avantage considérable pour coloniser la plantule, par priorité de niche (Newcombe *et al.*, 2018).

Il existe une grande variabilité dans la composition des communautés microbiennes de la graine, mais en général, les indices d' $\alpha$ -diversité calculés dans les études montrent que les communautés bactériennes sont plus riches en taxons que les communautés fongiques. Les communautés bactériennes associées aux graines sont principalement dominées par les mêmes phylums. Ainsi, les Actinobactéries, les Protéobactéries et les Firmicutes sont dominantes dans le microbiote des graines de différentes espèces de Brassicacées, Solanacées, Fabacées et Apiacées. Plus spécifiquement, les genres bactériens *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Sphingomonas* et *Xanthomonas* sont généralement associés aux graines (Barret *et al.*, 2015; Rezki *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020). Chez les champignons, les Dothideomycètes et les Tremellomycètes dominent le microbiote des graines et les genres fongiques *Alternaria* et *Cladosporium* sont fréquemment retrouvés dans les graines de différentes espèces de plantes (Hardoim *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Links *et al.*, 2014; Rezki *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

Il est intéressant de constater que malgré des spécificités d'habitat, l'ensemble des taxons retrouvés associés au microbiote des graines sont également fréquemment retrouvés sur racines et feuilles (Vorholt, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2013), ce qui laisse sous-entendre des migrations de microorganismes entre les différents habitats de la plante, et





souligne une probable transmission verticale de la graine vers les parties aériennes et racinaires.

*ii. Facteurs influençant le microbiote de la graine*

La structure et la diversité du microbiote des plantes sont influencées par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Le microbiote de la graine ne déroge pas à la règle. La présence de certains individus, pathogènes ou non sur/dans la graine influence la structuration de son microbiote. Par exemple, la transmission du champignon phytopathogène *Alternaria brassicicola* aux graines de radis est associée à des changements dans la structure des communautés fongiques expliqués à 63% par la présence du pathogène et caractérisés par une forte diminution de la diversité fongique des graines (Rezki *et al.*, 2016). De plus, la présence de la bactérie bénéfique *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN dans la graine de blé provoque des changements de structure des communautés bactériennes associés à la graine, avec notamment une nette augmentation de plus de 30% de l'abondance relative des  $\beta$ -Protéobactéries et une diminution de plus de 20% de l'abondance relative des  $\alpha$ -Protéobactéries (Mitter *et al.*, 2017).

Le site de production des graines joue également un rôle important dans la structuration du microbiote des graines. Cet effet a par exemple été montré dans des graines de haricot récoltées soit en Bretagne soit au Luxembourg : 12% et 40% des changements de structure des communautés bactériennes et fongiques sont respectivement expliqués par le lieu de récolte (Klaedtke *et al.*, 2016).

Le génotype de l'hôte joue également un rôle dans la structuration du microbiote des graines. Ainsi, une étude comparant les communautés bactériennes de 14 génotypes de graines de courges a montré des différences d'abondance relative et de diversité entre ces génotypes (jusqu'à 52,7% de variance expliquée par le génotype) (Adam *et al.*, 2018). Deux études comparant 6 et 5 génotypes de riz ont montré qu'une faible part des variations dans la structuration des communautés microbiennes des graines est attribuée au génotype de l'hôte mais que c'est surtout l'abondance relative des taxons qui est différente entre génotypes (Walitang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019). De même, chez le tabac, l'effet génotype (n=4) n'était pas significatif sur les indices d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -diversité, mais de fortes modifications de l'abondance relative des phylums et genres bactériens ont été reportées entre les génotypes (Chen *et al.*, 2020). De plus, une étude montrant une



forte phylosymbiose entre les communautés microbiennes associées aux graines et la nature du riz (sauvage ou domestiqué) permet de proposer une relation éco-évolutive intime en lien avec les différences génétiques provoquées par la domestication (Kim *et al.*, 2020). Ainsi, bien que son effet soit relativement faible comparé aux facteurs environnementaux comme la localisation géographique, le rôle du génotype de l'hôte dans la structuration des communautés microbiennes des graines ne doit pas être négligé.

#### 4. TRANSMISSION, EVOLUTION ET ROLE DU MICROBIOTE DE LA GRAINE

##### a. Germination et rôle du microbiote

Les graines sont classées en deux catégories biologiques selon leur capacité à survivre à la dessiccation et au froid. Les plus communes sont les graines orthodoxes. Au cours de leur maturation, elles sont capables de perdre jusqu'à 95% de leur teneur en eau tout en tolérant cette dessiccation extrême. Les graines orthodoxes réduisent au maximum leur métabolisme, et cet état de vie ralentie leur permet de résister à des températures extrêmes (Tweddle *et al.*, 2003). La conservation de ces graines est donc relativement facile. A l'inverse, les graines récalcitrantes sont des graines incapables de survivre à la dessiccation. Cela concerne entre 5 et 10% des espèces d'Angiospermes et notamment des plantes tropicales (Gaff & Oliver, 2013; Walters *et al.*, 2013). La capacité germinative des graines récalcitrantes diminue avec leur teneur en eau, et ce seuil varie en fonction de l'espèce de plante. La nécessité de maintenir un certain niveau d'humidité rend ces graines difficiles à conserver dans la durée, notamment du fait que cela favorise le développement de microorganismes pouvant altérer la qualité des graines (Walters *et al.*, 2013; Delahaie, 2013).

L'incroyable particularité propre aux graines orthodoxes est donc leur capacité à survivre dans cet état sec pendant des mois et même des années tout en conservant le moment venu leur capacité germinative. Cet état de quiescence dans lequel peut rester la graine dépend de nombreux facteurs environnementaux comme la lumière, la température, la tolérance à la dessiccation, mais il est également contrôlé génétiquement par la graine elle-même (Bentsink & Koornneef, 2008). Lorsque les conditions sont favorables (humidité, chaleur), les graines sortent de leur quiescence et entament le processus de germination. Cependant, certaines graines pourtant viables peuvent ne pas germer, même dans des conditions environnementales idéales. Ces graines sont dites dormantes. Selon les conditions environnementales, cela peut par exemple empêcher une



germination trop précoce qui ne garantirait pas la survie des plantules (Finch-Savage & Bassel, 2016). En fonction de l'espèce, la levée de la dormance peut être forcée par différentes méthodes, comme une brève exposition à une forte chaleur, une immersion dans l'eau, ou encore des scarifications du tégument de la graine.

La longévité correspond à la durée maximale que peut atteindre la graine avant de ne plus pouvoir germer. Plus les conditions de stockage sont respectées (faible température et humidité), plus une graine gagne en longévité. Par exemple, la longévité de la graine a été estimée chez le colza d'hiver sur des lots de graines conservés pendant 26 ans. L'étude a révélé une corrélation entre le temps de conservation et le taux de germination, passant de 94,7% l'année de récolte à 65,7% après 26 ans de conservation (Nagel *et al.*, 2011). Par ailleurs le succès de germination après une longue conservation des graines dépend également du génotype comme cela a été montré chez l'orge, soulignant un contrôle génétique de la dormance (Nagel *et al.*, 2015).

La dormance et la longévité sont deux paramètres importants pour la vigueur de la graine (Leprince *et al.*, 2017). La vigueur est définie comme l'ensemble des propriétés de la graine qui déterminent ses performances pendant la germination et la levée : rapidité, uniformité et taux de germination, vitesse de croissance, adaptation aux variations environnementales (Finch-Savage & Bassel, 2016).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle potentiel du microbiote des graines dans la germination. Par exemple, une forte activité des bactéries du genre *Bacillus* au niveau de la racine au moment de la germination, suggère un rôle de ces bactéries dans la germination, et en tant qu'inoculum primaire pour les racines en formation. Ces bactéries ont des capacités à entrer dans un état de vie ralentie, notamment en se différenciant en spores. Cela leur permet de survivre jusqu'à ce que la graine entre en germination (Cope-Selby *et al.*, 2017). Par ailleurs, certaines bactéries endophytes des graines semblent impliquées dans la production de cytokinines, phytohormones provoquant la levée de la dormance. La présence de ces endophytes favorise ainsi l'initiation de la germination (Goggin *et al.*, 2015). De plus, la bactérie *Methylobacterium* sp. peut migrer du sol vers la graine de plantes métalphytes (*Crotalaria pumila*) à travers le xylème. Sa présence dans la graine favorise la germination et promeut significativement la vitesse d'élongation de la racine. De plus, la présence de la bactérie



a des effets protecteurs sur la plantule en cas de stress métallique (Sánchez-López *et al.*, 2018).

Dans un autre exemple, la présence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* dans des graines d'*Arabidopsis thaliana* provoque un arrêt de la germination. Cet effet est dû à une molécule toxique produite par la bactérie qui signale à la graine sa présence. En retour, la graine accumule des répresseurs de germination afin d'éviter une éventuelle infection à la plantule (Chahtane *et al.*, 2018).

#### **b. Evolution du microbiote au cours de la germination et la levée**

La germination est l'étape durant laquelle la graine sèche s'imbibe d'eau. Cette imbibition favorise la reprise de l'activité métabolique initie l'élongation de la radicule qui va ensuite percer l'enveloppe (le tégument) de la graine (Bewley, 1997). Cette activité métabolique favorise la prolifération et l'activité des microorganismes dans la spermosphère (Nelson, 2018). Après germination de la graine, la radicule s'allonge dans le sol pour former les premières structures racinaires, puis les cotylédons se développent et émergent hors du sol, c'est ce qu'on appelle la levée. Tout au long de ces processus de germination et de levée, le microbiote de la plantule s'assemble à partir du microbiote de la graine et du microbiote du sol (Alekklett & Hart, 2013).

Une étude menée sur plusieurs espèces couvrant différentes familles de plantes (Brassicacées, Fabacées, Apiacées et Solanacées) a montré que la levée de la plantule était associée à une forte diminution de la diversité bactérienne et fongique en conditions axéniques (Barret *et al.*, 2015). Ces résultats soulignent une forte pression de sélection de la plantule sur le microbiote de la graine, et suggèrent également qu'une grande partie du microbiote de la plantule est acquise du sol. Par ailleurs, en conditions gnotobiotiques, la structure des communautés microbiennes évolue fortement entre la germination et la levée et certains taxons sélectionnés de la graine s'enrichissent lors de la levée (Barret *et al.*, 2015). De plus, l'injection de certaines bactéries endophytes des graines directement dans les plantules, permet leur colonisation et leur prolifération à l'intérieur des racines de maïs, suggérant leur capacité à être transmises de la graine à la plantule (Johnston-Monje & Raizada, 2011). Certains endophytes de la graine sont d'ailleurs retrouvés dans la rhizosphère, ce qui souligne la capacité du microbiote de la graine à se maintenir après germination et levée (Hardoim *et al.*, 2012).



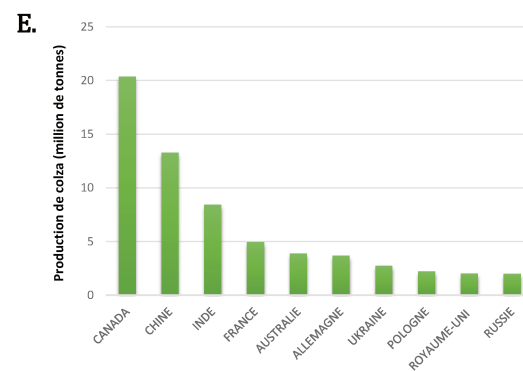
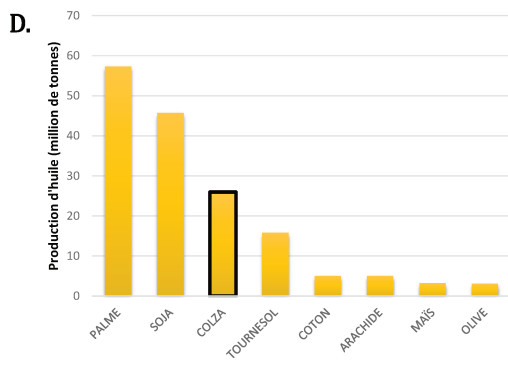
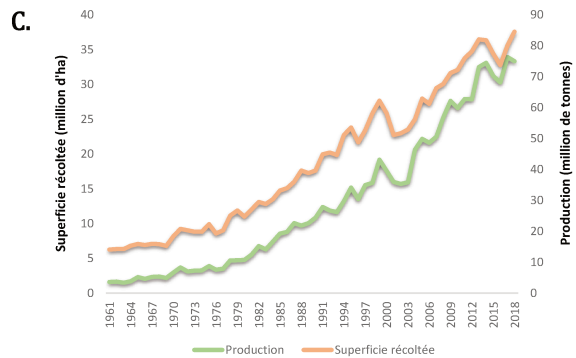
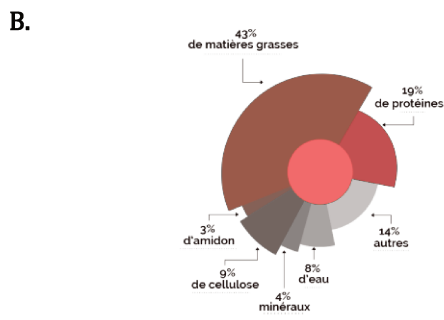
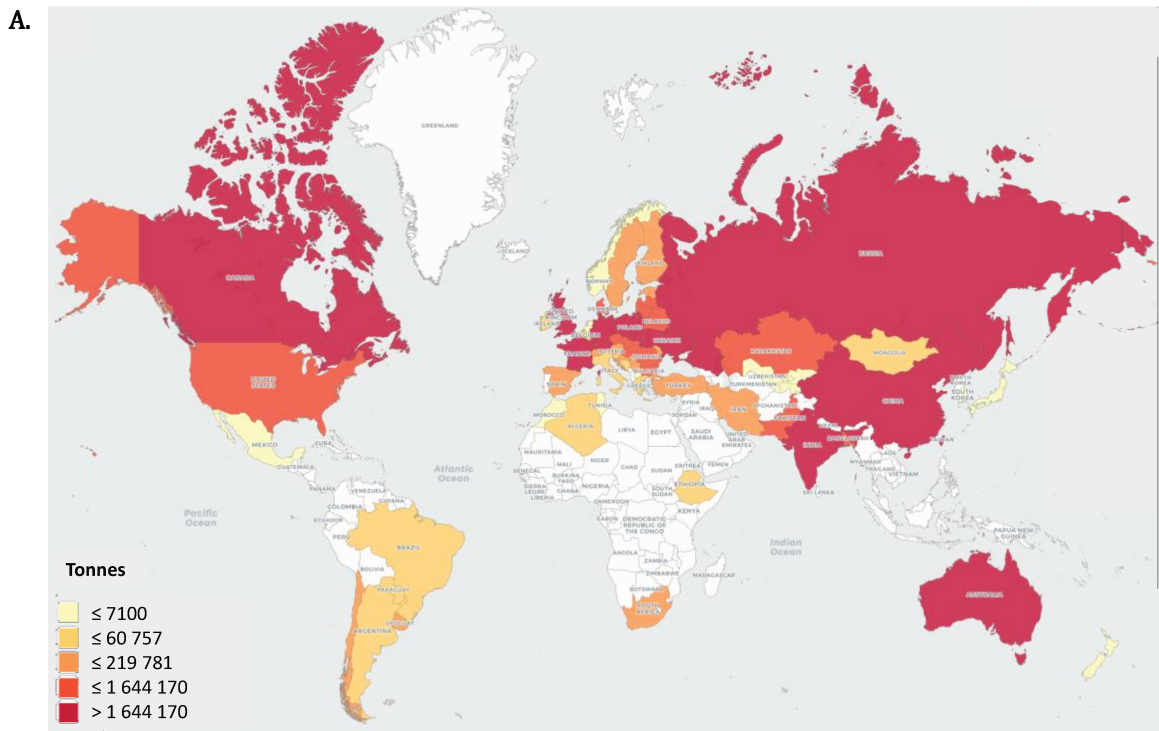


### c. Le microbiote de la graine à travers les générations

Une part très variable du microbiote de la graine est effectivement retrouvée dans les graines de la génération suivante. Chez le riz environ 45% des communautés bactériennes endophytes associées aux graines de la première génération sont retrouvés dans les graines de la seconde génération (Hardoim *et al.*, 2012). Chez le maïs, les graines des espèces domestiquées qui ont divergées au cours de l'évolution conservent une partie de leur microbiote endophyte commun (Johnston-Monje & Raizada, 2011). A l'inverse, chez le radis, une très faible héritabilité des taxons bactériens et fongiques des graines est observée sur trois générations successives (Rezki *et al.*, 2018). Cette étude a révélé l'importance de certains processus écologiques neutres tels que la dérive écologique et la dispersion dans la structuration des communautés bactériennes et fongiques des graines. Le microbiote des graines est composé de quelques taxons dominants sélectionnés par la plante et l'environnement et de nombreux taxons rares, dont l'assemblage est plutôt médié par des processus stochastiques non négligeables (Rezki *et al.*, 2018).

Enfin, chaque génération de graines de sétaire (*Setaria viridis*) récoltées sur des plantes cultivées en conditions axéniques possède une structure microbienne spécifique. Un important déclin de la richesse et la diversité du microbiote des graines au cours des générations est associé à une forte diminution de la capacité germinative des graines sur les dernières générations. Plusieurs leçons sont alors tirées de ces résultats : (i) le microbiote de la graine est important pour la germination, la croissance et la viabilité de la plante, (ii) le microbiote transmis de graines en graines est fortement filtré et la dérive écologique est un processus majeur dans la structuration du microbiote des graines, (iii) le sol est un réservoir important pour l'assemblage et la diversité du microbiote de la graine (Rodríguez *et al.*, 2019).

Bien que les articles cités dans les parties précédentes sont autant d'exemples de transmission verticale de microorganismes à et par les semences, le microbiote de la graine varie fortement d'une génération à l'autre, même au sein d'un génotype de plante donné.



**Figure 18 : Culture du colza en France et dans le monde.** (A) Quantité de production de colza à travers le monde en 2018. (B) Teneur de la graine de colza en matières grasses et protéines. (C) Evolution de la production mondiale de colza et de la superficie mondiale récoltée depuis 1961. (D) Position du colza dans le top 8 des cultures pour la production d'huile dans le monde. (E) Top 10 des pays producteurs de colza en 2018. Les données sont issues de la base de données de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (<http://www.fao.org/faostat/fr/>).

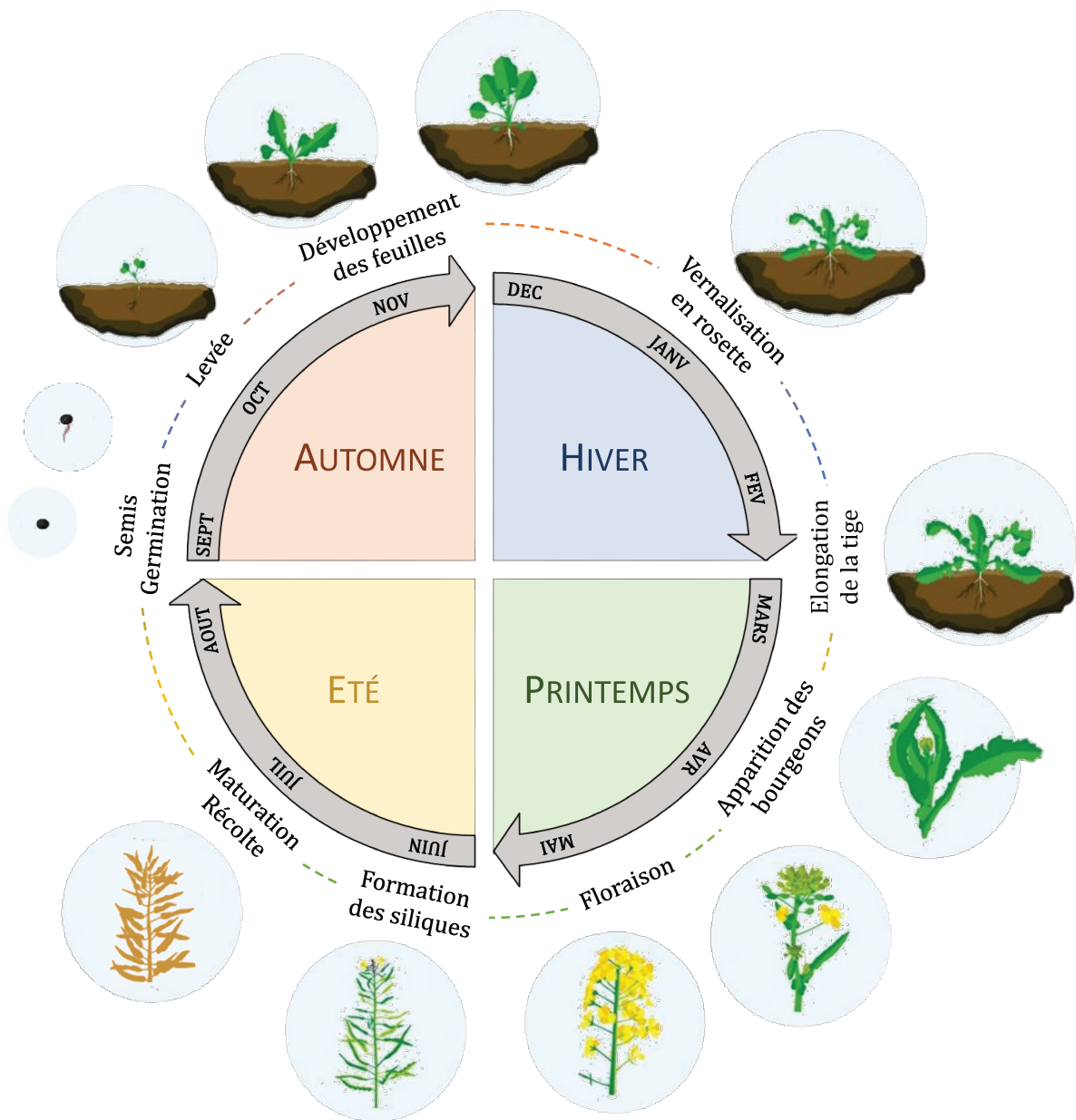
## C. LE COLZA

Le colza oléagineux *Brassica napus* L. est une plante cultivée de la famille des Brassicacées. Cette famille comprend 3660 espèces de plantes dont la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ainsi que de nombreuses plantes cultivées comme la moutarde, le radis, le chou, et la navette (Kiefer *et al.*, 2014).

### 1. INTERET AGRONOMIQUE ET ECONOMIQUE

Le colza est une plante annuelle qui peut être cultivée tant dans l'hémisphère nord que dans l'hémisphère sud. De ce fait, c'est une plante d'intérêt agronomique et économique mondial (**Fig. 18A**). Le colza est une plante oléagineuse dont les graines sont exploitées pour faire de l'huile végétale. Une fois l'huile extraite, le tourteau, co-produit issu de la trituration des graines est utilisé en nutrition animale comme source de protéines (**Fig. 18B**). Depuis les années 1960, face à un accroissement démographique ininterrompu, la production et la surface cultivée de colza n'a cessé d'augmenter (**Fig. 18C**) pour répondre à la demande croissante en huile alimentaire, en nutrition animale mais également plus récemment pour son usage dans la fabrication de bio-carburant.

Les variétés sont principalement sélectionnées pour leur productivité (en moyenne 32 q/ha), leur résistance aux maladies et la teneur de leurs graines en huile et en protéines (Masson & Leclerc, 2014). Cependant, l'histoire de la sélection du colza oléagineux a été marquée par deux évènements de conversion, tout d'abord la réduction du taux d'acide érucique dans les graines, qui a permis d'inscrire les variétés dites « 0+ », puis la réduction de la teneur en glucosinolates des graines (et inscription des variétés « 00 »). Ces deux conversions se sont faites très rapidement à partir de quelques accessions portant les mutations favorables et se traduisent par une structuration assez forte des variétés de colza oléagineux d'hiver en fonction de leur profil (++, 0+ et 00). L'acide érucique est un acide gras dont la toxicité pour l'homme est avérée (Knutsen *et al.*, 2016). Les glucosinolates sont une famille de métabolites qui, une fois convertis en composés actifs (comme les isothiocyanates et les nitriles), sont impliqués dans la défense de la plante contre les ravageurs (Rask *et al.*, 2000; Ishida *et al.*, 2014). Cependant, les glucosinolates sont responsables de propriétés organoleptiques telle que l'amertume ou l'acidité, provoquant une anti-appétence chez l'animal et à forte concentration, ils peuvent également provoquer une hypertrophie de la thyroïde chez certains animaux (Tripathi &



**Figure 19 : Cycle de développement du colza d'hiver au cours des saisons.** Le semis s'effectue entre fin août et début septembre. Les plantes entrent en vernalisation pour l'hiver. La floraison a lieu au printemps à partir du mois d'avril. En mai, les fleurs sont pollinisées et les premières siliques se forment. La récolte a lieu courant juillet.

Mishra, 2007). A ce jour, il existe 278 variétés de colza oléagineux d'hiver dites « double-zéro » (00) inscrites au Catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France (<https://www.geves.fr/catalogue/>). Le colza est aujourd'hui la troisième source d'huile végétale au monde derrière l'huile de palme et l'huile de soja (**Fig. 18D**) et avec presque 5M de tonnes produits en 2018, la France est le 4<sup>e</sup> pays producteur de colza derrière le Canada (20M), la Chine (13M) et l'Inde (8M) (**Fig. 18E**).

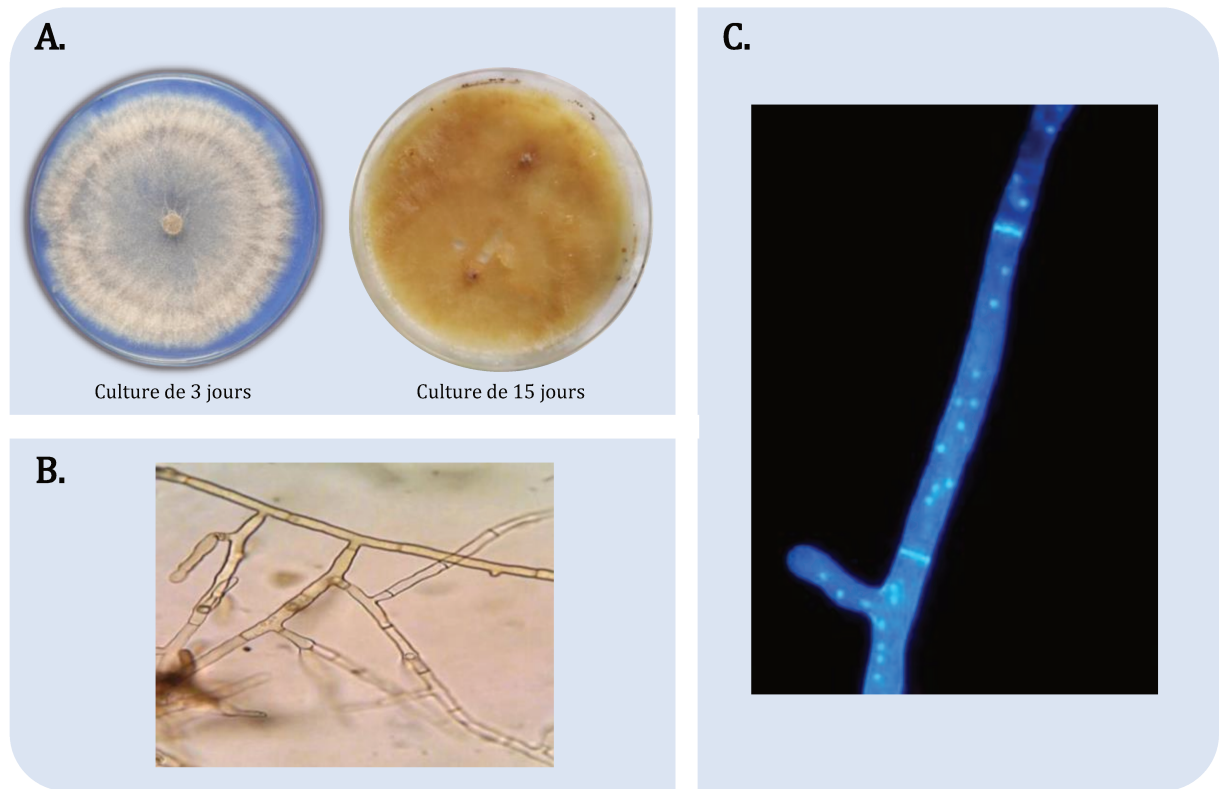
## 2. TAXONOMIE ET GENETIQUE

Le colza est une plante allotétraploïde ( $2n = 38$  chromosomes) issue du croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea* L.,  $2n = 18$ ) et la navette (*Brassica rapa* subsp. *oleifera*,  $2n = 20$ ) (Downey & Rimmer, 1994). Selon la saison du semis, on distingue deux principaux types de colza : le colza de printemps (semé en avril), et le colza d'hiver (semé en août/septembre). Dans ce manuscrit je traite exclusivement du colza d'hiver qui est la forme majoritairement cultivée en Europe de l'Ouest.

Ces 10 dernières années, des ressources génomiques ont été développées pour caractériser la variabilité génétique de *Brassica napus*. La puce SNP Illumina Infinium 60K développée par la communauté internationale a été largement utilisée en sélection et dans les projets de recherche (Clarke *et al.*, 2016). Cette puce contient de 52 157 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) répartis de manière homogène le long du génome (Clarke *et al.*, 2016; Mason *et al.*, 2017). L'intérêt de cette ressource est de pouvoir appréhender la proximité génétique pour un grand nombre de variétés et estimer la diversité génétique du colza.

## 3. LE CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU COLZA D'HIVER

Les graines du colza d'hiver sont semées au mois de septembre afin de germer durant l'automne et atteindre le stade rosette avant l'hiver. Afin d'accomplir sa phase végétative et d'entrer en phase de reproduction, le colza d'hiver nécessite une période de froid, appelée vernalisation. Ainsi le colza d'hiver reste au stade rosette de décembre à février avant d'entrer dans sa phase de reproduction au début du printemps. Au fur et à mesure que les journées s'allongent, la plante se développe et les premiers bourgeons apparaissent. A partir du mois d'avril, les inflorescences de colza au jaune caractéristique s'ouvrent et la pollinisation commence. Chaque fleur fécondée laisse place à une silique composée d'une vingtaine de graines. Au mois de juin, les fleurs fanent au profit des



**Figure 20 : Morphologie et particularités du champignon *Rhizoctonia solani*.** (A) Aspect d'une culture de la souche *R. solani* AG2-1 R5 sur milieu Malt agar à 3 jours et à 15 jours. Le mycélium jeune est blanc, puis il brunit au cours du temps. (B) Mycélium de *R. solani* aux hyphes cloisonnés (d'après Yadav *et al.*, 2019). (C) Hyphes polynucléés de *R. solani* AG1-1B observés au microscope à fluorescence. Les noyaux sont colorés au DAPI (d'après Liu *et al.*, 2014).

siliques dans lesquelles se développent les graines. Une fois à maturité, les siliques déhiscentes sont battues afin de récolter les graines (**Fig. 19**).

Le colza est une plante partiellement allogame, son taux de pollinisation (ou fécondation) croisée étant estimé à environ 30% (OGTR, 2011). Par ailleurs, le colza possède également une part d'autogamie lui permettant de s'auto-polliniser. Ainsi, dans le cas d'un effectif réduit de pollinisateurs par exemple, le colza peut compenser son taux de fertilisation en s'auto-fécondant (Chambó *et al.*, 2018). Cette part d'autogamie offre la possibilité de cultiver des génotypes de plante particuliers et de les isoler pour éviter la pollinisation croisée, préservant ainsi la pureté génétique de la lignée.

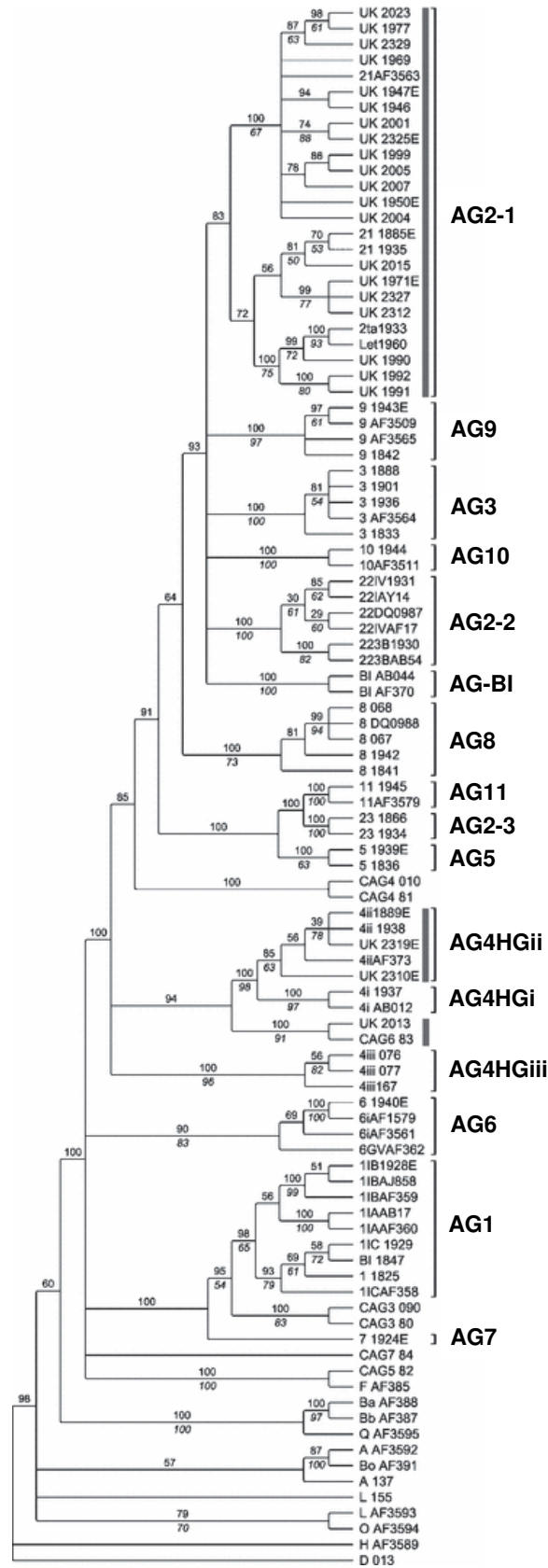
#### 4. LES MALADIES ASSOCIEES AU COLZA D'HIVER

Tout au long de son cycle de croissance, le colza d'hiver est la cible de pathogènes qui provoquent diverses maladies dont la gravité des symptômes varie selon le stade de développement de la plante et le pathogène impliqué. Parmi ces maladies, on peut entre autres citer la hernie des crucifères, provoquée par le protiste *Plasmodiophora brassicae*, qui forme des galles sur les racines, ou encore la verticilliose causée par le champignon *Verticillium* sp. qui infecte le système vasculaire de la plante et provoque un flétrissement des feuilles (Hwang *et al.*, 2012; Depotter *et al.*, 2016). A des stades plus précoces, la présence de certains champignons phytopathogènes dans le sol peut causer des dégâts économiques considérables notamment en provoquant des fontes de semis et en conséquences des manques à la levée conduisant à des pertes économiques importantes. Le rhizoctone brun est l'un de ces champignons provoquant des fontes de semis et des pourritures racinaires.

##### a. Le rhizoctone brun

###### i. Morphologie et classification

*Rhizoctonia solani* Kühn est un champignon phytopathogène vivant dans le sol et retrouvé dans le monde entier. Il s'agit d'une espèce extrêmement polyphage puisqu'elle est capable d'infecter une large gamme d'hôtes de diverses familles végétales, dont une grande partie sont des plantes cultivées (Anderson, 1982). Le nom *R. solani* est employé pour désigner le champignon sous sa forme anamorphe (*i.e.* asexuée). Sous sa forme téléomorphe (*i.e.* reproduction sexuée), le champignon est connu sous le nom *Thanatephorus cucumeris*.



**Figure 21 : Phylogénie des groupes et sous-groupes d'anastomose de *Rhizoctonia solani*.** Les distances ont été calculées à partir de l'analyse bayésienne des données de séquences de la région ribosomique ITS1, 5.8S et ITS2. D'après une investigation britannique menée par Budge *et al.*, 2009a.



*R. solani* est un basidiomycète caractérisé par un mycélium aux hyphes cloisonnés, brunissant à maturité et dont les cellules sont polynucléées (**Fig. 20**). Ce champignon présente une diversité génétique importante, caractérisée par des différences morphologiques, et lui conférant des propriétés moléculaires et biochimiques variées, et une capacité à infecter une large gamme d'hôtes distribuée sur diverses familles de plantes angiospermes et gymnospermes (Pinacées, Poacées, Solanacées, Brassicacées, Fabacées, Astéracées, ...). Ainsi, les membres de ce complexe d'espèces ont été classifiés en différents groupes appelés groupes d'anastomose (Carling, 1996). Les individus rassemblés dans le même groupe d'anastomose (AG) sont des individus capables de fusionner le cytoplasme de leurs cellules entre eux, dans un phénomène appelé anastomose des hyphes. A l'inverse, les individus de deux AG distincts ne sont pas capables d'anastomose entre eux, car leurs hyphes sont incompatibles. On distingue à ce jour 14 groupes d'anastomose (AG1 à AG13 et AG-BI) dont la gamme d'hôtes et les symptômes provoqués diffèrent (Anderson, 1982; Sturrock *et al.*, 2015; Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2017, 2018). Une phylogénie représentant la proximité des groupes d'anastomoses a été effectuée sur la base de la région ITS1-5.8S-ITS2 (**Fig. 21**) (Budge *et al.*, 2009b). Le même laboratoire a également développé des amorces spécifiques basées sur une portion de la région ITS1-ITS2 afin de distinguer les différents groupes d'anastomoses présents dans le sol (Budge *et al.*, 2009a).

Pour un même groupe d'anastomose ou un sous-groupe donné, le nombre de noyau par hyphe varie d'une cellule à l'autre. Ainsi, des cellules contenant 2 à 10 noyaux ont été observées chez deux souches du groupe d'anastomose AG1 (**Fig. 20C**), et certaines cellules contenaient même jusqu'à 12 noyaux chez des isolats du groupe AG4 (Seema *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). En plus de cette variabilité en terme de nombre de noyaux par hyphes, un polymorphisme de séquences nucléotidiques sur les copies de gènes d'un même isolat a également été reporté. C'est notamment le cas des régions intergéniques ITS1 et ITS2 pour lesquelles la séquence nucléotidique varie d'une copie à l'autre même pour un seul et même isolat. Par exemple, la région ITS ainsi que le gène codant l'ARNr 5.8S a été séquencée pour différents isolats appartenant au sous-groupe d'anastomose AG2-1 et les résultats ont révélé un polymorphisme variant de 0 à 12 SNP pour un même isolat (Pannecouque & Höfte, 2009).



**Figure 22 : Exemples de symptômes provoqués par le champignon phytopathogène *R. solani* sur plantules de colza. La tige est nécrosée à partir du collet.**

*ii. Rhizoctonia solani* AG2-1

Les souches de *R. solani* appartenant au groupe d'anastomose AG2-1 sont particulièrement agressives vis-à-vis du colza (Gugel *et al.*, 1987; Tewoldemedhin *et al.*, 2006; Sturrock *et al.*, 2015). L'infection à *R. solani* AG2-1 est très précoce et provoque notamment des fontes de semis et des pourritures au niveau des racines et des tiges dès les premiers stades de développement de la plante (germination, émergence). Présent dans le sol, le champignon peut rapidement envahir la graine en germination et pénétrer le système vasculaire de la plante par les racines. Il évolue ainsi jusqu'aux parties aériennes et provoque des pourritures notamment caractérisées par une nécrose visible en bas de la tige (**Fig. 22**) (Hannukkala *et al.*, 2016). La maladie a des conséquences dramatiques sur la croissance des plantes et leur rendement, causant notamment une stérilité, une sénescence prématurée et une diminution du nombre de siliques, et de ce fait une diminution de la quantité et de la qualité des graines (Kataria & Verma, 1992).

**b. Méthodes de lutte contre les maladies**

Aujourd'hui encore, les principaux moyens de lutte contre les maladies consistent à traiter les plantes avec des intrants chimiques à effet fongicide ou insecticide. Cependant, l'utilisation massive de ces pesticides sur les cultures provoque à plus ou moins long terme des dommages collatéraux irréversibles sur la santé animale et humaine, mais également sur la biodiversité (Campos *et al.*, 2019). Par exemple, l'usage d'intrants chimiques provoque à long terme une diminution de la diversité bactérienne des sols (Tan *et al.*, 2012). Par ailleurs, selon une étude du Commissariat Général au Développement Durable, en France, le coût de dépollution des eaux souillées par les pesticides oscillait entre 260 et 360 millions d'euros en 2011, et on peut imaginer qu'il n'a cessé d'augmenter depuis. C'est pour toutes ces raisons sanitaires, environnementales et économiques qu'en France, le plan Ecophyto visant à réduire l'usage des produits phytosanitaires a été lancé, l'objectif actuel étant de réduire de 50% leur utilisation d'ici 2025 (<https://agriculture.gouv.fr/ecophyto>). Pour y parvenir tout en assurant un maintien des productions, il convient donc de développer de nouvelles méthodes de lutte plus respectueuses de la santé et de l'environnement, comme par exemple sélectionner des variétés cultivables plus résistantes à certaines maladies. Malheureusement, en l'absence d'alternatives efficaces et moins coûteuses, les agriculteurs n'ont pas d'autre

**Tableau 2 : Rôle bénéfique des microorganismes associés au colza dans sa santé et sa croissance (adapté de Card *et al.*, 2015).**

	Espèces microbiennes	Rôle bénéfique	Références
<b>Bactéries Gram +</b>	<i>Bacillus</i> spp.	Antagonisme vis-à-vis de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Antagonisme vis-à-vis de <i>Leptosphaeria maculans</i>	Kun <i>et al.</i> , 2005 Ramarathnam & Fernando, 2006
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Antagonisme vis-à-vis de <i>Xanthomonas campestris</i> Antagonisme vis-à-vis de plusieurs champignons phytopathogènes	Wulff <i>et al.</i> , 2002 Danielsson <i>et al.</i> , 2007
	<i>B. endophyticus</i>	Antagonisme vis-à-vis de plusieurs champignons phytopathogènes	Danielsson <i>et al.</i> , 2007
	<i>B. subtilis</i>	Antagonisme vis-à-vis de <i>X. campestris</i> , Antagonisme vis-à-vis de <i>S. sclerotiorum</i>	Wulff <i>et al.</i> , 2002 Zhang <i>et al.</i> , 2009; Hu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Microbacterium</i> sp.	Résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques, promotion de la croissance des plantes dans les sols contaminés par les métaux lourds	Sheng <i>et al.</i> , 2008
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Antagonisme vis-à-vis de <i>Verticillium longisporum</i>	Granér <i>et al.</i> , 2003
	<b>Bactéries Gram -</b>	<i>Alcaligenes</i> sp.	Inhibition de <i>Verticillium dahliae</i>
<i>Enterobacter</i> sp.		Inhibition de <i>V. dahlia</i> , promotion de la croissance	Alström, 2001; Wang <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>		Inhibition de <i>V. dahlia</i> et de <i>V. longisporum</i>	Alström, 2001; Abuamsha <i>et al.</i> , 2011
<i>P. fluorescens</i>		Résistance aux métaux lourds, promotion de la croissance	Sheng <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhanella</i> sp.		Assimilation des métaux lourds, promotion de la croissance	He <i>et al.</i> , 2013
<i>Serratia proteamaculans</i>		Inhibition de <i>V. dahliae</i>	Alström, 2001
<i>S. plymuthica</i>		Favorise la germination Antagonisme vis-à-vis de <i>Verticillium longisporum</i>	Abuamsha <i>et al.</i> , 2010 Abuamsha <i>et al.</i> , 2011
<i>Stenotrophomonas</i> spp.		Inhibition de <i>V. dahlia</i>	Alström, 2001
<b>Champignons</b>	<i>Alternaria alternata</i>	Promotion de la croissance	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Aspergillus flavipe</i>	Réduction de maladie à <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Chaetomium globosum</i>	Activité anti-fongique contre <i>S. sclerotiorum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Activité anti-fongique contre <i>S. sclerotiorum</i> & <i>Botrytis cinerea</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	<i>F. tricinctum</i>	Promotion de la croissance	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	Promotion de la croissance, activité anti-fongique contre <i>S. sclerotiorum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014

choix que de continuer à utiliser les pesticides pour assurer un rendement correct de leurs productions et nourrir la planète.

Ainsi, plusieurs pistes sont explorées pour promouvoir la croissance et la santé des plantes. La **Tableau 2** reprend de nombreux exemples de bactéries et champignons dont le rôle bénéfique dans la santé du colza a été démontré (Card *et al.*, 2015). Certains de ces microorganismes ont par exemple des effets antagonistes forts contre certains pathogènes du colza comme *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ou *Sclerotinia sclerotiorum* (Wulff *et al.*, 2002; Kun *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Par ailleurs, des bactéries des genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia* isolées de graines de colza ont des propriétés d'antibiose vis-à-vis du champignon *Verticillium longisporum* (Granér *et al.*, 2003; Rybakova *et al.*, 2017). A défaut de fournir des alternatives durables pour la défense des plantes, l'ensemble de ces études laissent entrevoir la possibilité d'exploiter tout ou partie du microbiote des plantes pour lutter contre les agents phytopathogènes.



## D. OBJECTIFS DE THESE

Dans un contexte actuel où l'agriculture nécessite de nouveaux moyens pour promouvoir la santé et la croissance des plantes, les chercheurs tentent d'identifier de nouveaux leviers de pilotage plus respectueux de l'environnement en s'appuyant notamment sur l'optimisation des associations plantes-microbiote. Cependant, face à la complexité des interactions entre la plante et son microbiote, et avec une bonne connaissance actuelle de la composition taxonomique du microbiote, il est maintenant nécessaire de compléter les connaissances sur les processus écologiques qui façonnent l'assemblage du microbiote des plantes. La structure et la diversité du microbiote varient tantôt selon l'habitat étudié, les conditions climatiques et environnementales, la nature et la composition du sol, ou encore les spécificités d'interactions entre le génotype de plante et son microbiote. La difficulté à maîtriser tous ces facteurs et toute cette variabilité afin de déchiffrer les processus écologiques sous-jacents impliqués dans l'assemblage est donc complexe.

Pour pouvoir un jour proposer des solutions intégratives dans la protection des plantes, il est donc nécessaire de comprendre comment s'assemble le microbiote dans chaque compartiment de la plante et quels sont les facteurs majoritaires participant à la structuration de ces communautés. La diversité des communautés microbiennes associées aux racines et aux feuilles a été largement étudiée pour différentes espèces de plantes cultivées, et pour la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. *A contrario*, la diversité microbienne associée aux semences n'est étudiée que depuis quelques années, malgré l'enjeu qu'elles constituent en tant que source d'inoculum primaire pour la plante. On sait également que la graine est vecteur d'un microbiote diversifié dont une partie peut être transmise de manière verticale sur plusieurs générations. Il est ainsi envisageable qu'une partie de la diversité microbienne de la plante soit héritée de la graine, et que cette transmission influence la diversité du microbiote des différents habitats de la plante. Dans cette hypothèse, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Le microbiote de la graine participe-t-il à l'assemblage des communautés de micro-organismes associées aux autres habitats de la plante ?
- Quel est l'impact du microbiote de la graine sur les phénotypes étendus de l'hôte ?
- Comment la graine favorise-t-elle la colonisation primaire et secondaire du microbiote des plantes ?





Afin de répondre à ces différentes questions, la première étape de ma thèse fut de comprendre les facteurs influençant le microbiote des graines avec comme hypothèse que **la structure du microbiote de la graine de colza est influencée par le génotype de l'hôte et l'année de récolte**. Les résultats sont présentés dans le **Chapitre I** de ce manuscrit.

Les résultats de cette première étude ont permis de poser les fondations pour répondre aux questions de recherche que nous avons énoncées. Nous avons testé la double hypothèse que **le microbiote de la graine influence la structuration du microbiote associé à la racine et à la tige**, et que **cette influence dépend de la diversité microbienne du sol**. Les résultats supportant les conclusions de cette étude sont présentés dans le **Chapitre II** de ce manuscrit.

Dans le **Chapitre III** de cette thèse, nous avons cherché à comprendre l'impact du microbiote de la graine sur le parasitisme tellurique du colza, nos hypothèses étant qu'il **y a une influence du microbiote de la graine sur la réponse de la plante à une maladie tellurique**, et qu'une fois encore **cette influence est modulée par la diversité microbienne du sol**.

Enfin, dans le **Chapitre IV** nous nous sommes attelés à répondre à la dernière question de recherche en réduisant la complexité des communautés microbiennes sur graine. Pour cela, à partir de données de culturomique, nous avons été en mesure de constituer des communautés synthétiques, que nous avons appliquées sur graines. L'objectif principal de cette dernière étude était de **comprendre la cinétique de transmission de ces communautés de la graine à la plantule, et leur influence sur la structuration du microbiote de la plante et sa réponse à une maladie**.



# CHAPITRE I

---

**INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT ET DU GENOTYPE DE  
L'HOTE SUR LA STRUCTURE ET LA DIVERSITE DU MICROBIOTE  
DES GRAINES DE COLZA**

---



## CHAPITRE I : INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT ET DU GENOTYPE DE L'HOTE SUR LA STRUCTURE ET LA DIVERSITE DU MICROBIOTE DES GRAINES DE COLZA

---

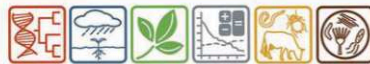
### PRESENTATION DU CHAPITRE

Ce premier chapitre est consacré à l'étude de la diversité microbiote des graines de colza. Nous avons voulu estimer l'influence relative du génotype et de l'environnement sur la structure du microbiote des graines. Nous avons sélectionné 9 génotypes de colza parmi la diversité génétique des colzas d'hiver disponibles au sein de notre institut. Afin d'estimer la réelle influence du génotype sur le microbiote, il fallait garantir la pureté génétique des lignées. Pour cela, les graines ont été produites par des plantes ensachées avant la floraison afin de favoriser l'autofécondation et d'éviter les croisements génétiques par pollinisation et dispersion du pollen entre plantes. Concernant l'environnement, les graines ont été produites pendant deux années consécutives dans un même champ et nous avons considéré l'année de récolte comme étant le facteur environnemental de cette étude. De plus les graines des années 1 et 2 sont toutes descendantes de la génération précédente de génotypes cultivés dans la même parcelle. Les graines ayant été produites chaque année dans le même champ, cela permet de limiter l'introduction de facteurs confondants pour l'étude, comme la localisation géographique, la nature du sol et le climat. En parallèle, nous avons collaboré avec le Geves afin de mesurer de manière automatisée la dynamique de germination de chaque lot de graines.

Le principal objectif de ce premier chapitre est de connaître les facteurs qui façonnent la structure et la diversité du microbiote des graines de colza et de comprendre sa variabilité. Une fois l'importance de ces facteurs connue, cela nous permettra ensuite d'étudier l'importance du microbiote des graines de colza dans différents contextes et par différentes approches.

Les résultats obtenus lors de cette première étude ont été valorisés dans un article intitulé « *Influence of environment and host plant genotype on the structure and diversity of the Brassica napus seed microbiota* » et publié dans **Phytobiomes Journal**, appartenant à la Société Américaine de phytopathologie (APS).





## RESEARCH

e-Xtra\*

## Influence of Environment and Host Plant Genotype on the Structure and Diversity of the *Brassica napus* Seed Microbiota

Aude Rochefort,<sup>1</sup> Martial Briand,<sup>2</sup> Coralie Marais,<sup>2</sup> Marie-Hélène Wagner,<sup>3</sup> Anne Laperche,<sup>1</sup> Patrick Vallée,<sup>1</sup> Matthieu Barret,<sup>2</sup> and Alain Sarniguet<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup> INRA, Agrocampus-Ouest, Université de Rennes 1, UMR 1349 IGEPP (Institute of Genetics, Environment and Plant Protection), 35653 Le Rheu, France

<sup>2</sup> INRA, Agrocampus-Ouest, Université d'Angers, UMR 1345 IRHS (Research Institute on Horticulture and Seeds), SFR4207 QuaSaV, 49071 Beaucozézé, France

<sup>3</sup> Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences, Beaucozézé, France

Accepted for publication 31 July 2019.

## ABSTRACT

Seeds are involved in the transmission of microorganisms from one plant generation to the next and consequently act as reservoirs for the plant microbiota. The driving processes influencing seed microbiota assemblage have not been yet deciphered because of confounding factors related to environmental location, agricultural practices, and host genotype selection. Nine genotypes were chosen among a large panel of genetically diverse *Brassica napus* accessions. The taxonomic structure of the seed microbiota was monitored by amplification and subsequent high-throughput sequencing of *gyrB* and internal transcribed spacer 1 markers for two successive years on seed lots collected from self-pollinated plants. Seed germination capacities were compared between all seed lots. Although harvesting year was the main driver of seed microbiota

composition, the host genotype also significantly altered the structure of seed microbial assemblages. The core microbiota of *B. napus* included nine fungal taxa shared between all the genotypes and years, while no bacterial taxa were conserved across all genotypes and years. The harvesting year had the major effect on seed germination but with some differences between genotypes. The study demonstrated the relative contribution of host- and environmental-filtering on the assemblage of the seed microbiota. It suggested some influence of these assemblages on seed germination.

**Keywords:** bacteriology, *Brassica napus*, ecosystems, environment, germination, host genotype, microbiome, mycology, seed microbiota, self-pollination

Plants live in association with a diverse and complex set of microorganisms also known as microbiota. The plant microbiota can modify several host traits, such as plant nutrition (Paredes et al. 2018), flowering kinetics (Panke-Buisse et al. 2015), and resistance against plant pathogens and herbivores (Haney et al. 2018; Kwak et al. 2018). Owing to such impacts on plant growth and health, it is of interest to decipher the biological and ecological processes involved in the assembly of the plant microbiota. Several studies have notably investigated the impact of

environmental factors and host genetic variation on the composition of plant microbiota (Bulgarelli et al. 2012; Edwards et al. 2015; Fitzpatrick et al. 2018; Horton et al. 2014; Peiffer et al. 2013; Pérez-Jaramillo et al. 2017). These studies have revealed a major impact of environment on the taxonomic structure of plant microbiota and a limited but significant contribution of the host genotype. Accordingly, it has been recently highlighted that community heritability ( $H^2_c$ ) (Van Opstal and Bordenstein 2015) of the maize rhizosphere microbiota is low, even if the abundance of some operational taxonomic units (OTUs) is significantly affected by host genetics (Walters et al. 2018). This broad-sense heritability ( $H^2$ ) of some bacterial taxa is probably linked to host genes involved in the recruitment of its microbiota, for instance genes related to specific plant metabolites and to plant immunity (Hacquard et al. 2017; Sasse et al. 2018).

In contrast to other plant habitats, diversity of seed microbial assemblages is restrained (Adam et al. 2018; Barret et al. 2015; Bergna et al. 2018; Klaedtke et al. 2016; Leff et al. 2017; Rezki et al. 2018; Rodríguez et al. 2018; Rybakova et al. 2017), perhaps as a consequence of a seed bottleneck for microbial transmission

<sup>†</sup>Corresponding author: A. Sarniguet; [alain.sarniguet@inra.fr](mailto:alain.sarniguet@inra.fr)

**Funding:** Support was provided by the Institut National de la Recherche Agronomique (Metaomics and Microbial Ecosystems metaprogram, Plant Health and Environment division) and the Conseil Régional de Bretagne (ARED).

\*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that six supplementary figures and four supplementary tables are published online.

The author(s) declare no conflict of interest.

© 2019 The American Phytopathological Society





(Newcombe et al. 2018; Paredes and Lebeis 2016). In fact, considering that rhizosphere and phyllosphere are plant habitats with a highly diversified and abundant microbiota, seeds act as a filter and select smaller sized and less diversified microbial assemblages. Therefore, the relative importance of vertical transmission from maternal plant to its progeny over horizontal transmission from the environment is probably limited in plants (Leff et al. 2017; Newcombe et al. 2018). Nevertheless, seeds represent the initial inoculum of the plant microbiota and can thus potentially impact plant fitness especially during its early development stages.

Rapidity and uniformity of seed germination and seedling growth together with emergence ability under adverse environmental conditions and performance after storage are collectively referred to as seed vigor (Finch-Savage and Bassel 2016). Seed vigor is determined by seed dormancy (Bentsink and Koornneef 2008) and seed longevity (Leprince et al. 2017); both traits being influenced by genetic and environmental perturbations. For instance, seed dormancy in *Brassica napus* is affected by the genotype and preharvest environmental conditions (Gruber et al. 2009; Gulden et al. 2004). In contrast to physiological and environmental factors, the impact of seed microbiota composition on seed vigor has not yet been explored. However, experimental evidences indicated that some plant-associated bacteria can repress germination through the production of oxyviniglycines (Chahtane et al. 2018; McPhail et al. 2010) or decrease dormancy through free cytokinins production (Goggin et al. 2015; Rodrigues Pereira et al. 1972). Hence, one may argue that changes in seed microbiota structure could ultimately result in differences of seed vigor.

The few studies that have investigated the importance of ecological processes involved in the assembly of the seed microbiota have reported that the environment significantly impacts the structure of the seed microbiota, and especially fungal assemblages (Klaedtke et al. 2016). Part of these studies has also highlighted that the host genotype could have a weaker but significant influence on bacterial endophytes of oilseed rape; however, it is difficult to eliminate environmental variations that could be confounding (Rybakova et al. 2017). In addition, neutral-based processes such as dispersal and ecological drift are also involved in the assembly of seed microbial assemblages (Rezki et al. 2018).

*B. napus* (oilseed rape) is a cropping plant cultivated worldwide for its oilseed and for protein cattle feed production. *B. napus* is sensitive to a range of soilborne plant pathogens including *Plasmodiophora brassicae*, *Rhizoctonia solani*, and *Verticillium longisporum*, which can cause clubroot, seedling damping-off, and Verticillium wilt, respectively (Hwang et al. 2012; Sturrock et al. 2015; Depotter et al. 2016). In absence of efficient control methods to restrict the populations of these phytopathogenic microorganisms, some biocontrol-based methods based on seed inoculation with microbial consortia have been proposed (Kataria and Verma 1992; Müller and Berg 2008). However, employing these seed inocula requires more basic knowledge on processes involved in assembly and dynamics of the seed microbiota (Barret et al. 2016). In this study, we estimated the impact of host genotypes and environment on the structure of the seed microbiota of nine genotypes representing the diversity of winter oilseed rape (WOSR) during two consecutive years. In addition, we explored the potential effect of seed microbiota composition on seed germination of these nine genotypes.

## MATERIALS AND METHODS

**Selection of WOSR genotypes.** A total of 116 cultivars of winter oilseed rape (*B. napus*), registered in France between the 1950s and

the 2000s, were gathered from the CRB BraCySol (INRA, IGEPP, France) to represent the diversity of inbred lines cultivated in Western Europe. All cultivars were genotyped with the Infinium Brassica 60K SNP array (Clarke et al. 2016). A set of 628 polymorphic single nucleotide polymorphisms presenting a low level of linkage disequilibrium ( $r^2 < 0.2$ ) were selected to analyze the structure of the genetic diversity within the accessions.

The structure of the collection was studied using admixture (Alexander et al. 2009) and 10 cross-validations. The genetic diversity of the collection was analyzed using Darwin software (Perrier and Bonnot 2003). Sokal and Michener genetic distances were estimated between each couple of cultivars, and then clustering was performed using unweighted pair group method with arithmetic mean. Nine *B. napus* genotypes, namely Astrid, Aviso, Boston, Colvert, Express, Major, Mohican, Tenor, and Zorro, were chosen among the collection (Supplementary Fig. S1, Supplementary Table S1) as representatives of *B. napus* diversity.

**Seed production.** The selected genotypes were cultivated in 2012–2013 (Y0) in the same experimental field (INRA, Le Rheu, France) to minimize the effect of any former environmental difference between genotypes, and under self-pollination cages to ensure autogamy and therefore produce genetically homogenous lines. The 2013 (Y0) seeds, harvested individually for each genotype were sown in 2015 in a field located close to the field dedicated to seed 2013 production. Pollination bags were applied over 20 plants per genotype after cutting off the early emerging flowers. The 2015–2016 (Y1) seeds of 20 plants were harvested and pooled independently for each genotype. In 2016–2017 (Y2), the seeds harvested for each genotype in the Y1 trial were sown in a field near the previous locations (INRA, Le Rheu, France) with the same cropping and harvesting process as Y1. GPS coordinates, distances between fields, and cropping history for each year are available in Supplementary Table S2. Climatic data for the cropping periods Y1 and Y2 are reported in Supplementary Figure S2. All seed lots harvested in Y1 and Y2 were stored in paper bags in dark dry conditions and at room temperature.

**Seed phenotyping.** Seed imbibition, germination, and early radicle growth were monitored in vitro with an automated phenotyping platform (Phenotic, SFR Quasav, Angers, France), which is described in detail in Ducourmau et al. (2004, 2005) and Wagner et al. (2012). Briefly, four subsamples of 25 seeds by genotype and year (Y1 and Y2) were incubated at 20°C on germination test paper (GE Healthcare, type 3644) continuously moistened for 5 days and image acquisition was performed every 2 h. Image acquisition, image analysis, and data analysis methods are described in Demilly et al. (2014). The following parameters were determined: seed area (Area; in mm<sup>2</sup>), volume 8 h after initiation of imbibition (Imb\_Vol; in mm<sup>3</sup>), radicle elongation after 8 h (Elon\_germ, in mm), mean germination time (germination, in hours), and time to reach 50% of germination per seed subsample (T50, in hours). Differences were assessed with Kruskal-Wallis tests and considered as significant at a *P* value of <0.01.

**Microbial DNA sample preparation.** DNA extraction was performed on five subsamples of 1,000 seeds (~4 g) per genotype (45 subsamples in total per year). First, seeds were soaked in 20 ml of phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 0.05% (vol/vol) of Tween 20, for 2 h 30 min under constant agitation (140 rpm) at room temperature. After this seed soak that enables the recovery of epiphytic and endophytic microorganisms (Barret et al. 2015), the suspensions were centrifuged (4,500 × *g*, 10 min) and DNA extraction was performed on the resulting pellets with the DNeasy PowerSoil HTP 96 Kit (Qiagen), following the manufacturer's procedure. Seed suspensions in PBS are classically performed in seed pathology (see International Seed Testing Association –ISTA: <https://www.seedtest.org/en/home.html>) to PCR-amplify bacterial



strains located in the endosperm (e.g., *Acidovorax citrulli* or *Xanthomonas citri*). Numerous antimicrobial compounds are associated to seed tissues and are released during grinding, which therefore can result in underestimation of seed microbial diversity.

**Libraries construction and sequencing.** An initial PCR amplification was performed with the primer sets *gyrB*\_aF64/*gyrB*\_aR553 (Barret et al. 2015) and internal transcribed spacer ITS1F/ITS2 (Buée et al. 2009), which target a portion of *gyrB* and the fungal ITS1 region, respectively. The cycling conditions for ITS1F/ITS2, were an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of amplification at 94°C (30 s), 50°C (45 s), and 68°C (90 s), and a final elongation step at 68°C for 10 min. The cycling conditions for *gyrB* were: initial denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles of amplification at 94°C (30 s), 55°C (45 s), and 68°C (90 s), and final elongation step at 68°C for 10 min. Amplicons were purified with magnetic beads (Sera-Mag, Merck). A second PCR amplification was performed to incorporate Illumina adapters and barcodes. PCR cycling conditions were identical for the two molecular markers: a first denaturation step at 94°C (1 min), followed by 12 cycles at 94°C (1 min), 55°C (1 min), and 68°C (1 min), and a final elongation at 68°C for 10 min. Amplicons were purified as previously described and quantified with the QuantIT PicoGreen dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific). All the amplicons were pooled in equimolar concentrations and the concentration of the equimolar pool was monitored with quantitative PCR (KAPA SYBR FAST, Merck). Amplicon libraries were mixed with 10% PhiX and sequenced with MiSeq reagent kit v2.500 cycles (one sequencing cartridge per year).

**Sequence processing.** Fastq files were processed with DADA2 version 1.6.0 (Callahan et al. 2016), using the parameters described in the workflow for “Big Data: Paired-end” ([https://benjjneb.github.io/dada2/bigdata\\_paired.html](https://benjjneb.github.io/dada2/bigdata_paired.html)). The only modification made relative to this protocol was a change in the `truncLen` argument according to the quality of the sequencing run. Taxonomic affiliations for amplicon sequence variants (ASV) generated with DADA2 were assigned with a naive Bayesian classifier (Wang et al. 2007) on an in-house *gyrB* database (Bartoli et al. 2018) and the UNITE v7.1 fungal database (Abarenkov et al. 2010).

**Microbial community analyses.** Analyses of diversity were conducted with the R package *Phyloseq* version 1.22.3 (McMurdie and Holmes 2013). Data were normalized based on sequencing depth, using a rarefaction of 1,100 and 15,000 sequences per sample for *gyrB* and ITS1, respectively. Observed richness (number of ASV per sample), estimated richness (Chao1 index), and inverse Simpson's index were calculated with *Phyloseq*. Faith's phylogenetic diversity was calculated on *gyrB* dataset with the R package *picante* version 1.6-2 (Kembel et al. 2010). Differences in alpha-diversity estimators between years and genotypes were assessed with Kruskal-Wallis tests. Differences were considered as significant at a *P* value of <0.01.

Changes in microbial assemblage composition were assessed with Bray-Curtis index and weighted UniFrac (wUF) distance (Lozupone and Knight 2005). Principal coordinate analysis (PCoA) was used for ordination of Bray-Curtis index and wUF distance. To quantify the relative contribution of plant generation and plant genotype in microbial community profiles, canonical analysis of principal coordinates was performed with the function `capscale` of the R package *vegan* 2.4.2 (Oksanen et al. 2017) followed with permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) (Anderson 2001).

A presence/absence matrix of common ASVs was constructed as follows. Common ASV was recorded as present if detected in all subsamples (*n* = 5) of one seed lot. One seed lot corresponded to seeds collected each year from each plant genotype. Visualization of genotype-specific ASVs and shared ASVs between plant genotypes was assessed for each year with the R package *UpSetR* (Lex et al. 2014). The number of common bacterial and fungal

ASVs between years for each individual genotype was also assessed using Venn diagrams. This binary matrix was used for assessing Jaccard and unweighted UniFrac distance (uUF) between genotypes. Comparisons of Sokal-Michener genetic distance and Jaccard/uUF distances were monitored with coefficient of determination.

Distribution of bacterial and fungal ASVs in other Brassicaceae seeds was assessed by investigating their prevalence in 479 seed samples associated to *B. oleracea*, *B. rapa*, and *Raphanus sativus* (Barret et al. 2015; Rezki et al. 2016, 2018).

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the Sequence Read Archive database under accession number PRJEB31617.

## RESULTS

**Diversity of the seed microbiota of *B. napus*.** Overall, 4,451 bacterial and 359 fungal ASVs were detected within *gyrB* and ITS1 datasets. ASV provided a finer resolution than OTU (Callahan et al. 2017), and this descriptor was therefore used for estimating the taxonomic structure of the seed microbiota of *B. napus*.

According to coverage estimates, the number of *gyrB* sequences was not sufficient for reaching the plateau after rarefaction, while saturation was achieved for fungal reads. Hence, predicted richness (Chao1 index) was assessed for bacterial assemblages, while observed richness (number of ASVs) was measured for fungal assemblages. Although bacterial and fungal richness were significantly different between the two harvesting years (*P* < 0.01), seed samples collected in Y2 contained on average fewer bacterial and more fungal ASVs than Y1 seed sample (Fig. 1A and D). The increase of fungal richness in Y2 was associated with a significant decrease in fungal diversity (Fig. 1E). While bacterial diversity did not differ between years (Fig. 1B), bacterial phylogenetic diversity (Faith's PD), was significantly higher in Y2 (*P* < 0.01) (Fig. 1C). In contrast to the harvesting year, no significant differences in  $\alpha$ -diversity estimators were observed between plant genotypes (*P* > 0.01).

Similarities in composition of bacterial and fungal assemblages were estimated with weighted UniFrac (wUF) distance and Bray-Curtis index, respectively. Ordination of wUF and Bray-Curtis revealed a significant clustering of seed-associated bacterial and fungal assemblages according to the harvesting year (Fig. 2, Table 1). The relative influence of the harvesting year and the plant genotype in assemblage composition was further inspected through canonical analysis of principal coordinates followed by PERMANOVA. Based on canonical analysis of principal coordinates, 16.4 and 65.5% of variances in bacterial and fungal assemblage compositions, respectively, were explained by the harvesting year (*P* < 0.01). Changes in bacterial and fungal assemblage compositions were also significantly (*P* < 0.01) explained by the plant genotype, with 19.3 and 11.5% of variances driven by this factor, respectively (Table 1). Interaction between harvesting year and genotype was significant (*P* < 0.01) and explained 16.6 and 13.3% of variances of bacterial and fungal assemblage compositions, respectively. When each year is analyzed separately, the impact of plant genotype (*P* < 0.01) ranged from 40 to 90% of explained variance (Table 1, Supplementary Fig. S3). However, similarity in assemblage compositions between genotypes were different in Y1 and Y2.

**Core and specific fractions of the *B. napus* microbiota.** Differences in relative abundance of bacterial orders between genotypes were mostly observed within Y1 (Fig. 3A). Notably we detected a higher abundance of Sphingomonadales and Pseudomonadales in Astrid, Aviso, and Boston in comparison with the other genotypes (Fig. 3A). However, these differences between genotypes were not detected in Y2, where principal variations were related to increase in relative

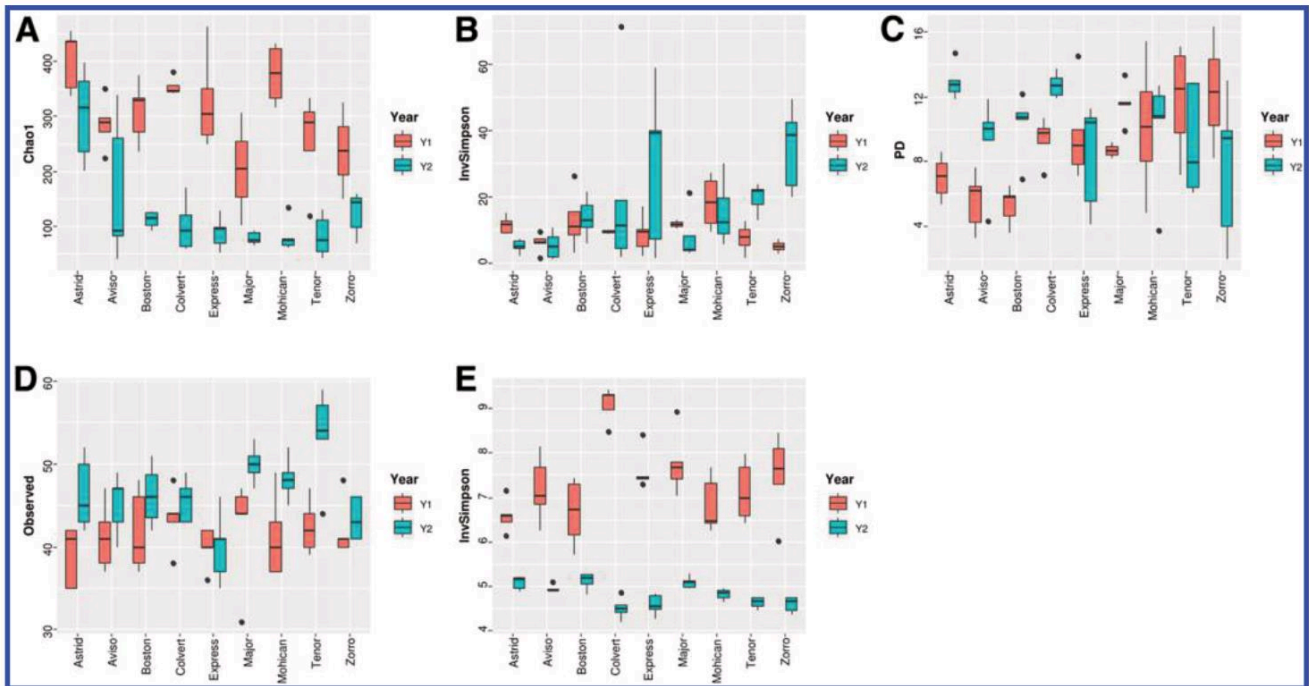


abundance of Enterobacteriales in Express and Zorro. Regarding fungal assemblages, differences in relative abundance of fungal orders were mostly observed between harvesting years, with a decrease in relative abundance of Tremellales and Helotiales in Y2 (Fig. 3B).

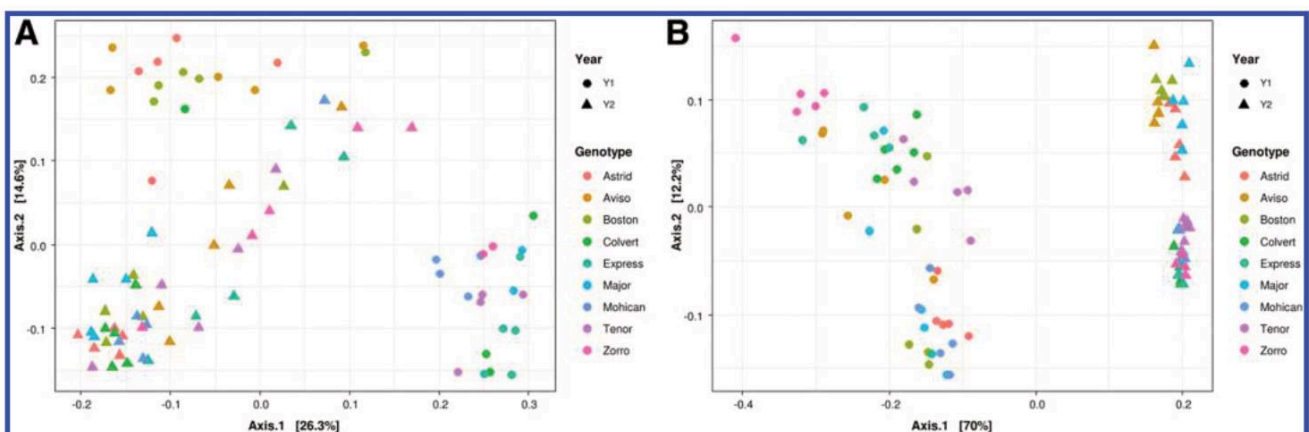
The distribution of ASVs between plant genotypes for each year of production was also assessed (Figs. 4 and 5). Among the 15 bacterial ASVs systematically detected in at least one genotype in Y1, none were shared between all genotypes (Fig. 4A). In Y2, six bacterial ASVs (out of 268) were shared between all genotypes (Fig. 4B). Four of these six ASVs have been already detected in more than 10% of seed samples ( $n = 479$ ) collected from various

Brassicaceae including *B. oleracea*, *B. rapa*, and *R. sativus* (Table 2). The inheritance of bacterial ASVs between years was quite low, since only three genotypes (Astrid, Aviso, and Boston) possessed four and five ASVs in common in Y1 and Y2, respectively (Supplementary Fig. S4). These ASVs shared between both years are related to *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, and *Frigoribacterium*.

Fungal assemblages shared more ASVs between all genotypes in comparison with bacterial assemblages. Indeed, 18 (out of 37) and 19 (out of 52) fungal ASVs were shared between all the genotypes in Y1 and Y2, respectively (Fig. 5). For each genotype, 35



**Fig. 1.** Diversity of seed-associated microbial assemblages of *Brassica napus*. Seed samples of nine genotypes were collected during two consecutive years (Y1 and Y2). Community profiling of the seed microbiota was performed on five seed subsamples per genotype. **A**, Estimated richness (Chao1 index), **B**, diversity (inverse Simpson's index), and **C**, phylogenetic diversity (Faith's phylogenetic diversity index) were monitored with *gyrB* amplicon sequence variants (ASVs) for bacteria. **D**, Observed richness (number of detected ASVs) and **E**, diversity (inverse Simpson's index) were assessed with internal transcribed spacer 1 ASVs for fungi.



**Fig. 2.** Similarities in microbial composition between *Brassica napus* genotypes seed-associated microbial assemblages. Similarities in seed microbial composition were estimated with **A**, weighted UniFrac distance and **B**, Bray-Curtis index for bacterial and fungal assemblages, respectively. Principal coordinate analysis was used for ordination of weighted UniFrac distance and Bray-Curtis index. Samples are colored according to their genotypes, while shape corresponded to the 2 years of production.



to 40% fungal ASVs were conserved from Y1 to Y2. In addition, nine fungal ASVs were systematically detected during both years. These fungal ASVs are also highly prevalent in seed samples of other Brassicaceae species (Table 2). There were very few bacterial ASVs specifically associated to one genotype in Y1, while there were in general more specific bacterial ASVs per genotype in Y2. Conversely, very few genotypes harbor specific fungal ASVs in Y1 as in Y2 (Supplementary Table S3 and S4).

**Relationship between *B. napus* genotypes and seed microbiota composition.** To assess if the composition of the seed microbiota could be related to genetic relatedness of *B. napus*, we compared Sokal-Michener genetic distance to Jaccard and uUF distances calculated with ITS1 and *gyrB* sequences, respectively (Supplementary Fig. S5). Coefficient of determination between Jaccard/uUF distances and Sokal-Michener distance were low for bacterial ( $r^2 = 0.026$  in Y1;  $r^2 = 0.009$  in Y2) and fungal ( $r^2 = 0.005$  in Y1;  $r^2 = 0.117$  in Y2) assemblages. While a significant ( $P = 0.002$ ) positive correlation between genetic distance and fungal assemblage composition was detected in Y2, the overall genetic

similarities between the *B. napus* genotypes employed in this work is not a robust predictor of seed microbiota composition.

**Impact of production year and host genotype on seed phenotypes.** There were no significant differences between years and genotypes for seed area, radicle elongation and imbibition speed (Supplementary Fig. S6). However, according to average germination rate ( $n = 100$ ), germination of seed samples harvested in Y1 was significantly ( $P < 0.01$ ) slower than germination of seed samples harvested in Y2 (Fig. 6). Significant differences were also observed between genotypes within specific year. For instance, seeds from Astrid germinated on average earlier ( $P < 0.01$ ) than the other genotypes in Y1 but not in Y2 (Fig. 6). Seeds from Tenor had a slower mean germination time ( $P < 0.01$ ) in comparison with the other genotypes but only for samples collected in Y2 (Fig. 6). Thus, another metric, T50, varied in the same way as mean germination time. Of note, three bacterial ASVs were specifically associated with Astrid in Y1. Moreover, three bacterial ASVs and five fungal ASVs were specifically associated to Tenor in Y2.

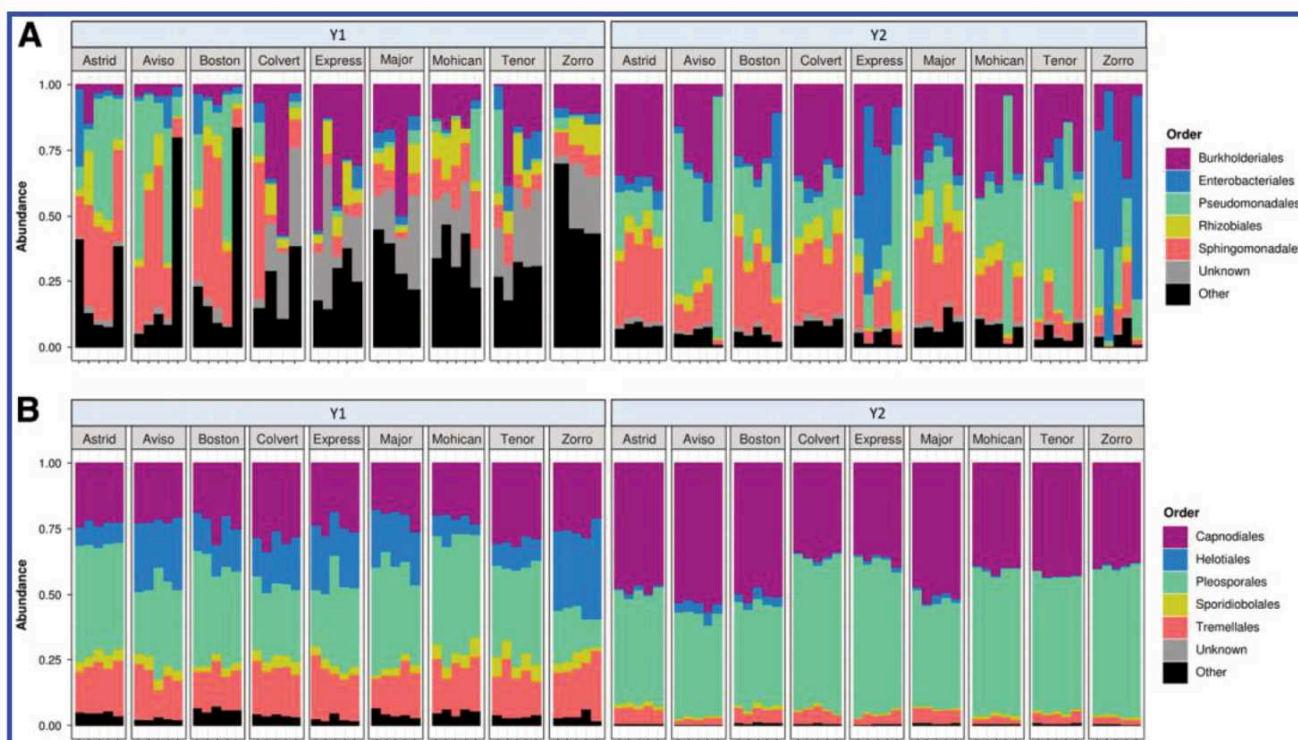
## DISCUSSION

The aim of this study was to assess the relative influence of the environment (i.e., year) and the host genotype on the structure of the *B. napus* seed microbiota. To eliminate environmental variations within a year, we sowed seeds of nine *B. napus* genotypes in the same field. In addition, to ensure homogeneous genetic material and preserve genotype specificities, each individual plant was cultivated in self-pollination.

Over two years we observed a decrease in bacterial richness for seed samples collected during the second year. This loss of bacterial

	Year	Genotype	Year: Genotype	Genotype (Y1)	Genotype (Y2)
<i>gyrB</i>	16.4	19.3	16.6	44.0	40.8
ITS1	65.5	11.5	13.3	66.2	90.7

<sup>a</sup> Percentage of explained variance estimated with permutational multivariate analysis of variance ( $P < 0.01$ ) for  $\beta$ -diversity of bacterial (*gyrB*) and fungal (internal transcribed spacer 1 [ITS1]) assemblages.



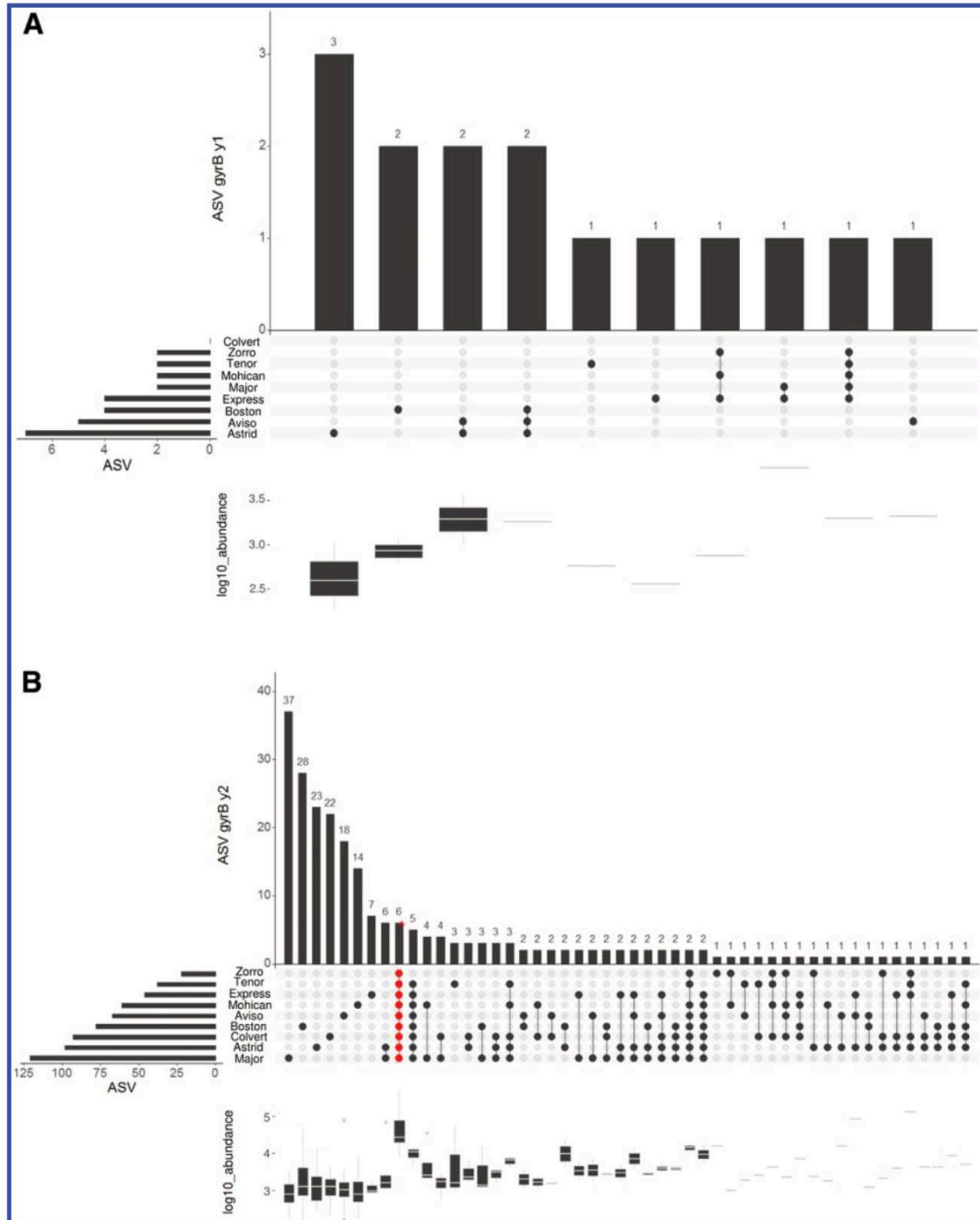
**Fig. 3.** Taxonomic composition of *Brassica napus* seed microbiota. Relative abundance of the most abundant **A**, bacterial and **B**, fungal orders within *B. napus* seed samples collected from nine genotypes across two successive generations (Y1 and Y2). Taxonomic affiliation of bacterial and fungal amplicon sequence variants (ASVs) was performed with an in-house *gyrB* database (Bartoli et al. 2018) and the UNITE v7.1 database (Abarenkov et al. 2010), respectively. Unknown taxa represented ASVs that are not affiliated at the order level.





richness could be explained by a selection of bacterial taxa across years in an analogous process that has been described for continuous cropping (Zhao et al. 2018). Loss of bacterial richness might be related to the repeated self-pollination process, which limits

dispersal of individuals among local bacterial assemblages (Vannette and Fukami 2017). If this assumption was correct, a similar reduction of richness would be expected within seed fungal assemblages. However, fungal richness increased in Y2. Therefore,

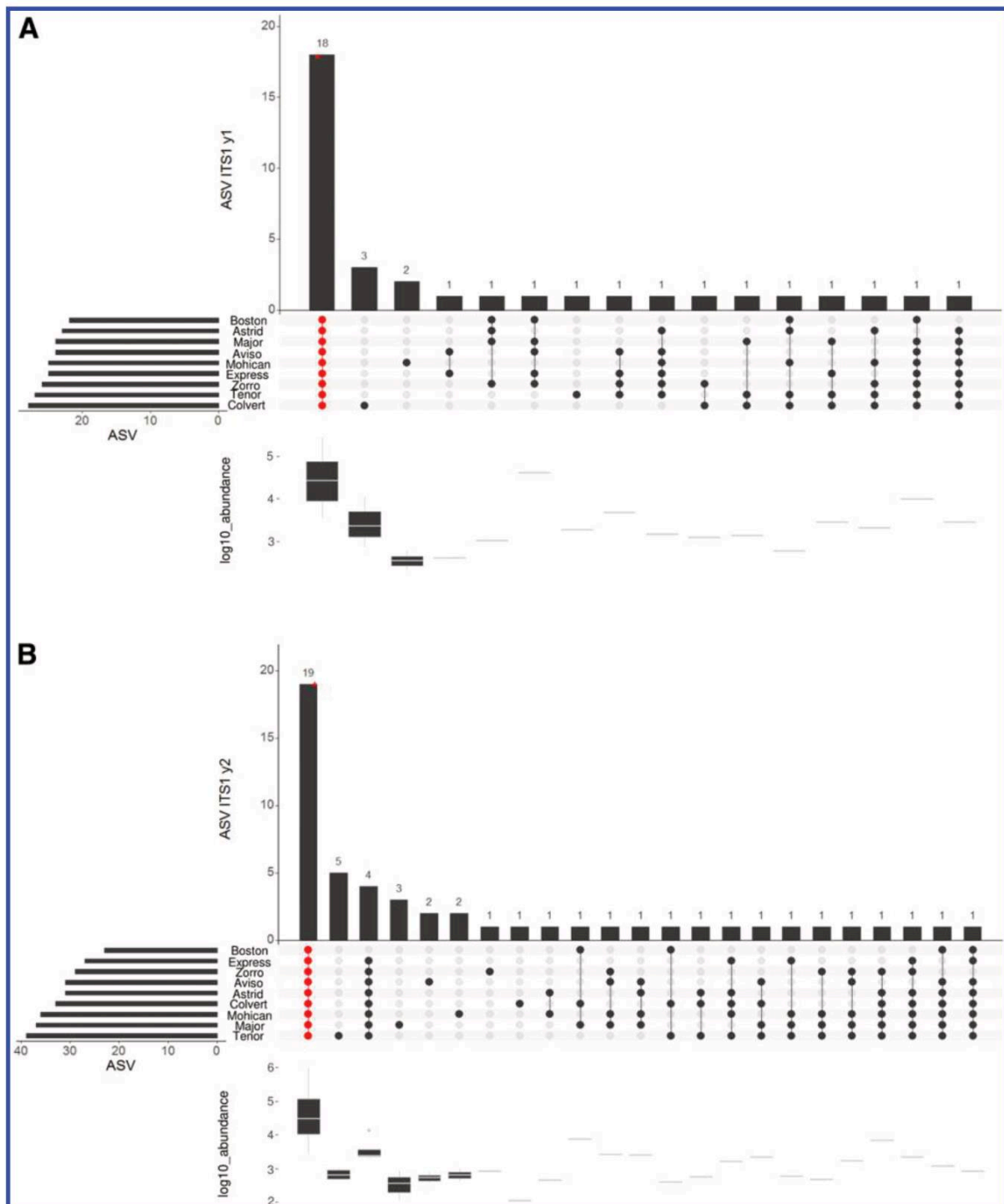


**Fig. 4.** Generalist and specific bacterial amplicon sequence variants (ASVs). Prevalence of bacterial ASVs across plant genotypes were investigated with UpSetR (Lex et al. 2014). Upper histograms represented the number of ASVs associated to one specific intersection in **A**, year 1 (Y1) or **B**, year 2 (Y2). Plant genotype associated with each particular intersection is highlighted with a dot. Intersection associated with all genotypes is displayed in red. The histogram located on the left of each UpSetR representation indicates the number of ASVs per genotype. Finally, boxplot represents the median relative abundance (log<sub>10</sub>) of bacterial ASVs associated with each intersection.



alteration of richness could be solely due to differences in richness of local microbial assemblages between years. Influence of the harvesting year was the main driving factor of seed fungal assemblage composition with 65.5% of explained variance. These

results agree with a previous report showing that seed fungal assemblages of common bean are mostly shaped by crop management practices and geographical locations (Klaedtke et al. 2016). The high impact of environmental filtering on composition of the fungal



**Fig. 5.** Generalist and specific fungal amplicon sequence variants (ASVs). Prevalence of fungal ASVs across plant genotypes were investigated with UpSetR (Lex et al. 2014). Upper histograms represent the number of ASVs associated with one specific intersection in **A**, year 1 (Y1) or **B**, year 2 (Y2). Plant genotype associated with each particular intersection is highlighted with a dot. Intersection associated with all genotypes is displayed in red. The histogram located on the left of each UpSetR representation indicates the number of ASVs per genotype. Finally, boxplot represents the median relative abundance (log<sub>10</sub>) of fungal ASVs associated with each intersection.



fraction of the seed microbiota could be related to local biogeographical patterns of fungal assemblages (Peay et al. 2016).

Diversity and composition of the *B. napus* seed microbiota was different between years but also between the host genotypes used in this study. Host genotype is an important driver in the assembly of the seed microbiota, especially for the bacterial fraction. The impact of host genotypes on the structure of *B. napus* microbiota was already highlighted for endophytic bacteria (Rybakova et al. 2017). Since seed lots employed by Rybakova et al. (2017) were collected from different geographical regions, the influence of host genotype was therefore inseparable from the influence of the environment.

Our study confirmed without any confounding factor that the structure of the *B. napus* seed bacterial assemblage are partly genotype-dependent. Since interaction between year and genotype was significantly influencing  $\beta$ -diversity, we assessed the influence of host genotypes on microbiota compositions for each year. According to these analyses, the plant genotype explained a major part of variation in seed microbial assemblage composition, therefore suggesting an important influence of host-filtering in the assembly of the seed microbiota. However, composition of seed microbial assemblage differed greatly between harvesting years. In addition, a small part of the *B. napus* seed bacterial assemblage is

**TABLE 2**  
**Core members of *Brassica napus* seed microbiota<sup>a</sup>**

ASV	Taxonomy	Y1 (%)	Y2 (%)	Others (%)
<b>Bacteria</b>				
ASV00001	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.0	100.0	90.6
ASV00003	<i>Ralstonia pickettii</i>	0.0	100.0	0.6
ASV00028	<i>Pseudomonas</i>	20.0	100.0	34.9
ASV00038	<i>Sphingomonas</i>	0.0	100.0	10.6
ASV00046	<i>Frigoribacterium</i>	10.0	100.0	11.1
ASV00124	<i>Burkholderiales</i>	0.0	100.0	0.0
<b>Fungi</b>				
ASV0001	<i>Alternaria infectoria</i>	100.0	100.0	72.6
ASV0002	<i>Cladosporium</i>	100.0	100.0	97.6
ASV0003	<i>Cladosporium delicatulum</i>	100.0	100.0	100.0
ASV0004	<i>Botrytis fabae</i>	100.0	100.0	47.9
ASV0005	<i>Sporidiobolales</i>	100.0	100.0	60.1
ASV0006	<i>Alternaria infectoria</i>	100.0	100.0	66.2
ASV0007	<i>Alternaria brassicae</i>	100.0	90.0	95.4
ASV0008	<i>Cryptococcus victoriae</i>	100.0	0.0	34.8
ASV0009	<i>Cryptococcus victoriae</i>	100.0	0.0	37.5
ASV0010	<i>Cryptococcus oëirensis</i>	100.0	0.0	37.8
ASV0011	<i>Filobasidium stepposum</i>	100.0	100.0	95.4
ASV0012	<i>Alternaria infectoria</i>	100.0	100.0	62.8
ASV0013	<i>Alternaria infectoria</i>	0.0	100.0	47.0
ASV0014	<i>Bulleromyces</i>	100.0	0.0	0.3
ASV0015	<i>Bensingtonia</i>	100.0	90.0	58.5
ASV0017	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	100.0	20.0	12.8
ASV0018	<i>Cryptococcus oëirensis</i>	0.0	100.0	0.0
ASV0019	<i>Udeniomyces pannonicus</i>	60.0	100.0	14.0
ASV0021	<i>Cladosporium aggregatocitricatum</i>	100.0	100.0	47.3
ASV0022	<i>Alternaria</i>	90.0	100.0	0.3
ASV0025	<i>Cryptococcus victoriae</i>	0.0	100.0	0.0
ASV0028	<i>Cryptococcus tephrensensis</i>	100.0	90.0	32.9
ASV0029	<i>Cryptococcus carnescens</i>	90.0	100.0	32.9
ASV0030	<i>Cladosporium perangustum</i>	0.0	100.0	4.6
ASV0038	<i>Phaeosphaeria caricicola</i>	100.0	0.0	11.9
ASV0041	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	0.0	100.0	5.2
ASV0044	<i>Cryptococcus victoriae</i>	0.0	100.0	0.0
ASV0054	<i>Ramularia vizellae</i>	0.0	100.0	0.9

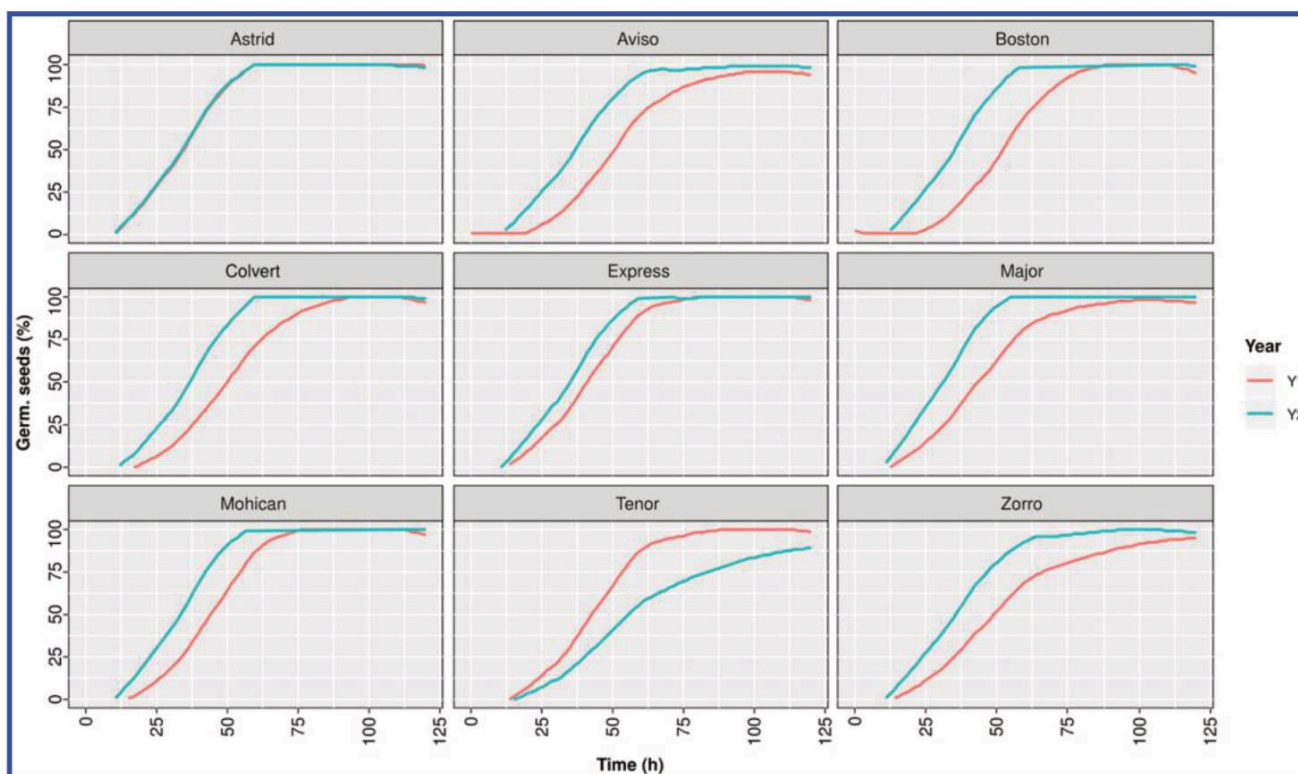
<sup>a</sup> Prevalence (expressed as a percentage) of each amplicon sequence variants (ASV) in *B. napus* seed samples collected in year 1 (Y1), year 2 (Y2), and in seed samples (Others) of *B. oleracea*, *B. rapa*, and *Raphanus sativus* reported by Barret et al. (2015) and (Rezki et al. 2016, 2018).



inherited from one generation to the next. Overall, our study highlighted a low inheritance of bacterial and fungal assemblages across *B. napus* generations. Indeed, no bacterial ASV were consistently detected between plant generations, while nine fungal ASVs were conserved between years. The absence of conserved bacterial ASV between year and genotypes could be explained by a stronger impact of host-filtering on assembly of the bacterial fraction of the seed microbiota. Alternatively, the absence of generalist bacterial ASV observed between years could be partly explained by the weak number of bacterial ASVs detected in Y1. The inheritance of seed-borne microbial taxa is quite low, therefore confirming previous observations performed on *R. sativus* over three consecutive generations (Rezki et al. 2018) and *Solanum lycopersicum* over two generations (Bergna et al. 2018). Hence, the main acceptable conclusion is that few microbial taxa associated with seeds are inherited and that most of seed-borne taxa represented cases of horizontal transmission (Leff et al. 2017). Despite these changes in assemblage compositions, the ASVs detected on seed samples corresponded to microbial taxa frequently associated with other seed samples. For instance, four of the bacterial generalists detected in Y2, namely *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, and *Frigoribacterium*, were already detected in more than 10% of other Brassicaceae seed lots (Barret et al. 2015; Rezki et al. 2018). Hence, these taxa might be adapted to the seed habitat. The case was different for fungi with a significant number of fungal ASVs recovered through generations. However this does not mean that these taxa are vertically transmitted. Assessing the relative importance of vertical and horizontal transmission will require an in-depth analysis of the seed transmission pathways (internal, floral and external) employed by these fungal taxa. Therefore, it is tempting to speculate that these

differences in seed microbiota composition between years are the result of fluctuations of the local microbial reservoir. In this way, specific microbial recruitment and selection by the genotypes are modulated among years. Consequently, the relative impact of the host genotype on the structure of seed microbial assemblages is difficult to predict, as it is dependent of fluctuations of the local reservoir.

Previous works performed on the rhizosphere and phyllosphere of multiple maize genotypes have highlighted a relatively low  $H^2$  of microbial taxa (Wallace et al. 2018; Walters et al. 2018). Although the number of genotypes employed in our study precluded the measurement of this broad-sense heritability, we did not establish any significant link between the genetic distance of the nine genotypes and their microbial distances. While considering the variability between subsamples collected from plants of the same genotype and cultivated on the same field, in addition to the relative influence of environment and host genotype, there is a contribution of other neutral-based processes on the assembly of the seed microbiota (Rezki et al. 2018). However, some specific plant functions and traits, and especially genes implicated in plant immune system, shape the structure and diversity of their own microbiota (Horton et al. 2014; Li et al. 2018). Thus, it would be necessary to use a larger number of genetically diverse genotypes of WOSR to explore this hypothesis at a finer resolution (i.e., intraspecies). To date, some studies failed to establish this link even when microbial diversification due to genetic diverse plant species was demonstrated (Bouffaud et al. 2012; Schlaeppli et al. 2014). However, establishing a direct correlation between genotypes and their microbiota would be of great interest for selecting genotypes with a specific microbiota in which certain taxa would ensure positive functions for the plant fitness.



**Fig. 6.** Dynamics of seed germination of each genotype and year. Germination was monitored in vitro with an automated phenotyping platform (Phenotic; Ducournau et al. 2004, 2005; Wagner et al. 2012). Four subsamples of 25 seeds by genotype and year (Y1 and Y2) were incubated at 20°C on germination paper (GE Healthcare, type 3644) continuously moistened for 5 days, and image acquisition was performed every 2 h.





Among different observed seed phenotypes, only the mean germination time and T50 (half-mean germination time) varied between years. Seed germination progresses through three phases (Bewley 1997). The first phase, known as imbibition, is a physical process driven by difference in water potential between the inside and the outside of the seed. Based on seed volume monitored during 8 h after initiation of imbibition, no significant differences in imbibition was observed between seed samples. This observation suggested that seed moisture was quite comparable between seed samples and that the resulting differences in germination kinetics are related to later phases. Since the environmental factor (year) more strongly shapes the bacterial and fungal communities, we assessed whether the change in microbiota composition could explain variation in germination rates. Authors demonstrated that the environmental conditions, age of seed and genotype (He et al. 2014; Leprince et al. 2017; Nagel et al. 2015) affect different seed performances like secondary dormancy and seed vigor. The requirement to perform germination assays for all seed samples simultaneously ultimately results in differences in longevity of seed collected in Y1 and Y2. However, long-term storage (i.e., several years) of *B. napus* seeds samples does not impact germination time but rather germination percentage (Nagel et al. 2011), which was not different between Y1 and Y2. Moreover, Astrid and Tenor genotypes did not support the ageing effect hypothesis as their germination rates were either similar or inverted, respectively, between Y1 and Y2 compared with the other genotypes. In addition, for Tenor different bacterial and fungal ASVs were effectively described in seed assemblages. Seed moisture cannot be involved as there was no significant differences during imbibition phase. Therefore, because of the most probable assumption of microbiota involvement, further experiments are required to investigate further the implication of microbial assemblages in germination or extended seed phenotypes variations.

In conclusion, the microbial assemblages of *B. napus* seeds are mainly influenced by the environment but to a lesser extent by the plant genotype. The inheritance of some abundant bacterial and fungal ASVs also differs between genotypes. Further studies will explore more extensively the host genetic determinants driving the microbial assemblages and the impact of such assemblages on seed vigor.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Muriel Bahut from the ANAN platform (SFR Quasav) for amplicon sequencing, the Phenotic Platform for performing seed germination experiments, and Thomas Baldwin for English proofreading. We apologize to authors whose relevant work was not included in this article due to space constraints.

## LITERATURE CITED

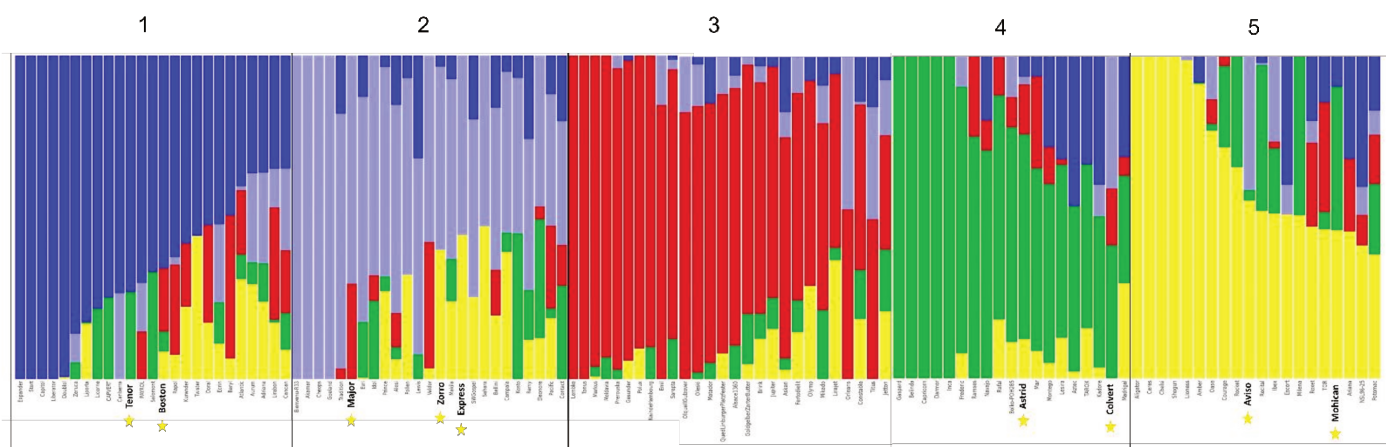
- ▶ Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjoller, R., Larsson, E., Pennanen, T., et al. 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi—Recent updates and future perspectives. *New Phytol.* 186:281-285.
- ▶ Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., and Berg, G. 2018. The *Cucurbita pepo* seed microbiome: Genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant Soil* 422:35-49.
- ▶ Alexander, D. H., Novembre, J., and Lange, K. 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 19:1655-1664.
- ▶ Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral. Ecol.* 26:32-46.
- ▶ Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P., and Jacques, M.-A. 2015. Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:1257-1266.
- ▶ Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A., and Jacques, M.-A. 2016. Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Mol. Plant Pathol.* 17:791-795.
- ▶ Bartoli, C., Frachon, L., Barret, M., Rigal, M., Huard-Chauveau, C., Mayjonade, B., Zanchetta, C., Bouchez, O., Roby, D., Carrère, S., et al. 2018. In situ relationships between microbiota and potential pathobiota in *Arabidopsis thaliana*. *ISME J.* 12:2024-2038.
- ▶ Bentsink, L., and Koornneef, M. 2008. Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book* 6:e0119.
- ▶ Bergna, A., Cernava, T., Rändler, M., Grosch, R., Zachow, C., and Berg, G. 2018. Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes. *Phytobiomes J.* 2:183-193.
- ▶ Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055-1066.
- ▶ Bouffaud, M.-L., Kyselková, M., Gouesnard, B., Grundmann, G., Muller, D., and Moëne-Loccoz, Y. 2012. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? *Mol. Ecol.* 21:195-206.
- ▶ Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., and Martin, F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184:449-456.
- ▶ Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., et al. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91-95.
- ▶ Callahan, B. J., McMurdie, P. J., and Holmes, S. P. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11:2639-2643.
- ▶ Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13:581-583.
- ▶ Chahtane, H., Nogueira Fuller, T., Allard, P.-M., Marcourt, L., Ferreira Queiroz, E., Shanmugabalaji, V., Falquet, J., Wolfender, J.-L., and Lopez-Molina, L. 2018. The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in *Arabidopsis*. *C. S. Hardtke and D. J. Kliebenstein*, eds. *eLife* 7:e37082.
- ▶ Clarke, W. E., Higgins, E. E., Plieske, J., Wieseke, R., Sidebottom, C., Khedikar, Y., Batley, J., Edwards, D., Meng, J., Li, R., et al. 2016. A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimized selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theor. Appl. Genet.* 129:1887-1899.
- ▶ Demilly, D., Ducournau, S., Wagner, M.-H., and Dürr, C. 2014. Digital imaging of seed germination. Pages 147-164 in: *Plant Image Analysis*. S. Gupta and Y. Ibaraki, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ▶ Depotter, J. R. L., Deketelaere, S., Inderbitzin, P., Tiedemann, A. V., Höfte, M., Subbarao, K. V., Wood, T. A., and Thomma, B. P. H. J. 2016. *Verticillium longisporium*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts. *Mol. Plant Pathol.* 17:1004-1016.
- ▶ Ducournau, S., Feutry, A., Plainchault, P., Revillon, P., Vigouroux, B., and Wagner, M. H. 2004. An image acquisition system for automated monitoring of the germination rate of sunflower seeds. *Comput. Electron. Agric.* 44: 189-202.
- ▶ Ducournau, S., Feutry, A., Plainchault, P., Revillon, P., Vigouroux, B., and Wagner, M. H. 2005. Using computer vision to monitor germination time course of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Seed Sci. Technol.* 33: 329-340.
- ▶ Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., and Sundaresan, V. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:E911-E920.
- ▶ Finch-Savage, W. E., and Bassel, G. W. 2016. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *J. Exp. Bot.* 67: 567-591.
- ▶ Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., and Johnson, M. T. J. 2018. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115: E1157-E1165.
- ▶ Goggin, D. E., Emery, R. J. N., Kurepin, L. V., and Powles, S. B. 2015. A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Ann. Bot. (Lond.)* 115:293-301.
- ▶ Gruber, S., Emrich, K., and Claupein, W. 2009. Classification of canola (*Brassica napus*) winter cultivars by secondary dormancy. *Can. J. Plant Sci.* 89:613-619.
- ▶ Gulden, R. H., Thomas, A. G., and Shirliffe, S. J. 2004. Relative contribution of genotype, seed size and environment to secondary seed dormancy potential in Canadian spring oilseed rape (*Brassica napus*). *Weed Res.* 44:97-106.



- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., and Schulze-Lefert, P. 2017. Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55:565-589.
- Haney, C. H., Wiesmann, C. L., Shapiro, L. R., Melnyk, R. A., O'Sullivan, L. R., Khorasani, S., Xiao, L., Han, J., Bush, J., Carrillo, J., et al. 2018. Rhizosphere-associated *Pseudomonas* induce systemic resistance to herbivores at the cost of susceptibility to bacterial pathogens. *Mol. Ecol.* 27:1833-1847.
- He, H., de Souza Vidigal, D., Snoek, L. B., Schnabel, S., Nijveen, H., Hilhorst, H., and Bentsink, L. 2014. Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 65:6603-6615.
- Horton, M. W., Bodenhausen, N., Beilsmith, K., Meng, D., Muegge, B. D., Subramanian, S., Vetter, M. M., Vilhjálmsson, B. J., Nordborg, M., Gordon, J. I., et al. 2014. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana*'s leaf microbial community. *Nat. Commun.* 5:5320.
- Hwang, S.-F., Strelkov, S. E., Feng, J., Gossen, B. D., and Howard, R. J. 2012. *Plasmiodiophora brassicae*: A review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Mol. Plant Pathol.* 13:105-113.
- Kataria, H. R., and Verma, P. R. 1992. *Rhizoctonia solani* damping-off and root rot in oilseed rape and canola. *Crop Prot.* 11:8-13.
- Kembel, S. W., Cowan, P. D., Helmus, M. R., Cornwell, W. K., Morlon, H., Ackerly, D. D., Blomberg, S. P., and Webb, C. O. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26:1463-1464.
- Klaedtke, S., Jacques, M.-A., Raggi, L., Prévèaux, A., Bonneau, S., Negri, V., Chable, V., and Barret, M. 2016. Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environ. Microbiol.* 18:1792-1804.
- Kwak, M.-J., Kong, H. G., Choi, K., Kwon, S.-K., Song, J. Y., Lee, J., Lee, P. A., Choi, S. Y., Seo, M., Lee, H. J., et al. 2018. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nat. Biotechnol.* 36:1100-1109.
- Leff, J. W., Lynch, R. C., Kane, N. C., and Fierer, N. 2017. Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. *New Phytol.* 214:412-423.
- Leprince, O., Pellizzaro, A., Berriri, S., and Buitink, J. 2017. Late seed maturation: Drying without drying. *J. Exp. Bot.* 68:827-841.
- Lex, A., Gehlenborg, N., Strobelt, H., Vuilleumot, R., and Pfister, H. 2014. UpSet: Visualization of intersecting sets. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 20:1983-1992.
- Li, Y., Wu, X., Chen, T., Wang, W., Liu, G., Zhang, W., Li, S., Wang, M., Zhao, C., Zhou, H., et al. 2018. Plant phenotypic traits eventually shape its microbiota: A common garden test. *Front. Microbiol.* 9:2479.
- Lozupone, C., and Knight, R. 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8228-8235.
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8: e61217.
- McPhail, K. L., Armstrong, D. J., Azevedo, M. D., Banowitz, G. M., and Mills, D. I. 2010. 4-Formylaminoxyvinylglycine, an herbicidal germination-arrest factor from *Pseudomonas* rhizosphere bacteria. *J. Nat. Prod.* 73:1853-1857.
- Müller, H., and Berg, G. 2008. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oilseed rape. *BioControl* 53:905-916.
- Nagel, M., Kranner, I., Neumann, K., Rolletschek, H., Seal, C. E., Colville, L., and Fernández-Marín, B., Börner, A. 2015. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. *Plant Cell Environ.* 38:1011-1022.
- Nagel, M., Rosenhauer, M., Willner, E., Snowdon, R. J., Friedt, W., and Börner, A. 2011. Seed longevity in oilseed rape (*Brassica napus* L.)—Genetic variation and QTL mapping. *Plant Genet. Resour.* 9:260-263.
- Newcombe, G., Harding, A., Ridout, M., and Busby, P. E. 2018. A hypothetical bottleneck in the plant microbiome. *Front. Microbiol.* 9:1645.
- Oksanen, J., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., and Wagner, H. 2017. *Vegan: Community ecology package*. R package version 2.4-2.
- Panke-Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., Ley, R. E., and Kao-Kniffin, J. 2015. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME J.* 9:980-989.
- Paredes, S. H., Gao, T., Law, T. F., Finkel, O. M., Mucyn, T., Teixeira, P. J. P. L., González, I. S., Felcher, M. E., Powers, M. J., Shank, E. A., et al. 2018. Design of synthetic bacterial communities for predictable plant phenotypes. *PLoS Biol.* 16:e2003962.
- Paredes, S. H., and Lebeis, S. L. 2016. Giving back to the community: Microbial mechanisms of plant–soil interactions. *Funct. Ecol.* 30:1043-1052.
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., and Talbot, J. M. 2016. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 14:434-447.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Buckler, E. S., and Ley, R. E. 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:6548-6553.
- Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., Bosse, M., Ferrão, L. F. V., de Hollander, M., Garcia, A. A. F., Ramírez, C. A., Mendes, R., and Raaijmakers, J. M. 2017. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *ISME J.* 11:2244-2257.
- Perrier, X., and Bonnot, O. 2003. *Methods of data analysis. Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rezki, S., Campion, C., Iacomi-Vasilescu, B., Preveaux, A., Toualbia, Y., Bonneau, S., Briand, M., Laurent, E., Hunault, G., Simoneau, P., et al. 2016. Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *PeerJ* 4:e1923.
- Rezki, S., Campion, C., Simoneau, P., Jacques, M.-A., Shade, A., and Barret, M. 2018. Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant Soil* 422:67-79.
- Rodrigues Pereira, A. S., Houwen, P. J. W., Deurenberg-Vos, H. W. J., and Pey, E. B. F. 1972. Cytokinins and the bacterial symbiosis of *Ardisia* species. *Z. Pflanzenphysiol.* 68:170-177.
- Rodriguez, C. E., Mitter, B., Barret, M., Sessitsch, A., and Compant, S. 2018. Commentary: Seed bacterial inhabitants and their routes of colonization. *Plant Soil* 422:129-134.
- Rybakova, D., Mancinelli, R., Wikström, M., Birch-Jensen, A.-S., Postma, J., Ehlers, R.-U., Goertz, S., and Berg, G. 2017. The structure of the *Brassica napus* seed microbiome is cultivar-dependent and affects the interactions of symbionts and pathogens. *Microbiome* 5:104.
- Sasse, J., Martinoia, E., and Northen, T. 2018. Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci.* 23:25-41.
- Schlaeppi, K., Dombrowski, N., Oter, R. G., Ver Loren van Themaat, E., and Schulze-Lefert, P. 2014. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:585-592.
- Sturrock, C. J., Woodhall, J., Brown, M., Walker, C., Mooney, S. J., and Ray, R. V. 2015. Effects of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-1 on roots of wheat and oil seed rape quantified using X-ray computed tomography and real-time PCR. *Front. Plant Sci.* 6:461.
- van Opstal, E. J., and Bordenstein, S. R. 2015. Rethinking heritability of the microbiome. *Science* 349:1172-1173.
- Vannette, R. L., and Fukami, T. 2017. Dispersal enhances beta diversity in nectar microbes. *Ecol. Lett.* 20:901-910.
- Wagner, M.-H., Ducournau, S., Luciani, A., and Léchappé, J. 2012. From knowledge-based research towards accurate and rapid testing of seed quality in winter rape. *Seed Sci. Res.* 22:S80-S85.
- Wallace, J. G., Kremling, K. A., Kovar, L. L., and Buckler, E. S. 2018. Quantitative genetics of the maize leaf microbiome. *Phytobiomes J.* 2:208-224.
- Walters, W. A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J. G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., Shi, Q., et al. 2018. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115:7368-7373.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5261-5267.
- Zhao, Q., Xiong, W., Xing, Y., Sun, Y., Lin, X., and Dong, Y. 2018. Long-term coffee monoculture alters soil chemical properties and microbial communities. *Sci. Rep.* 8:6116.

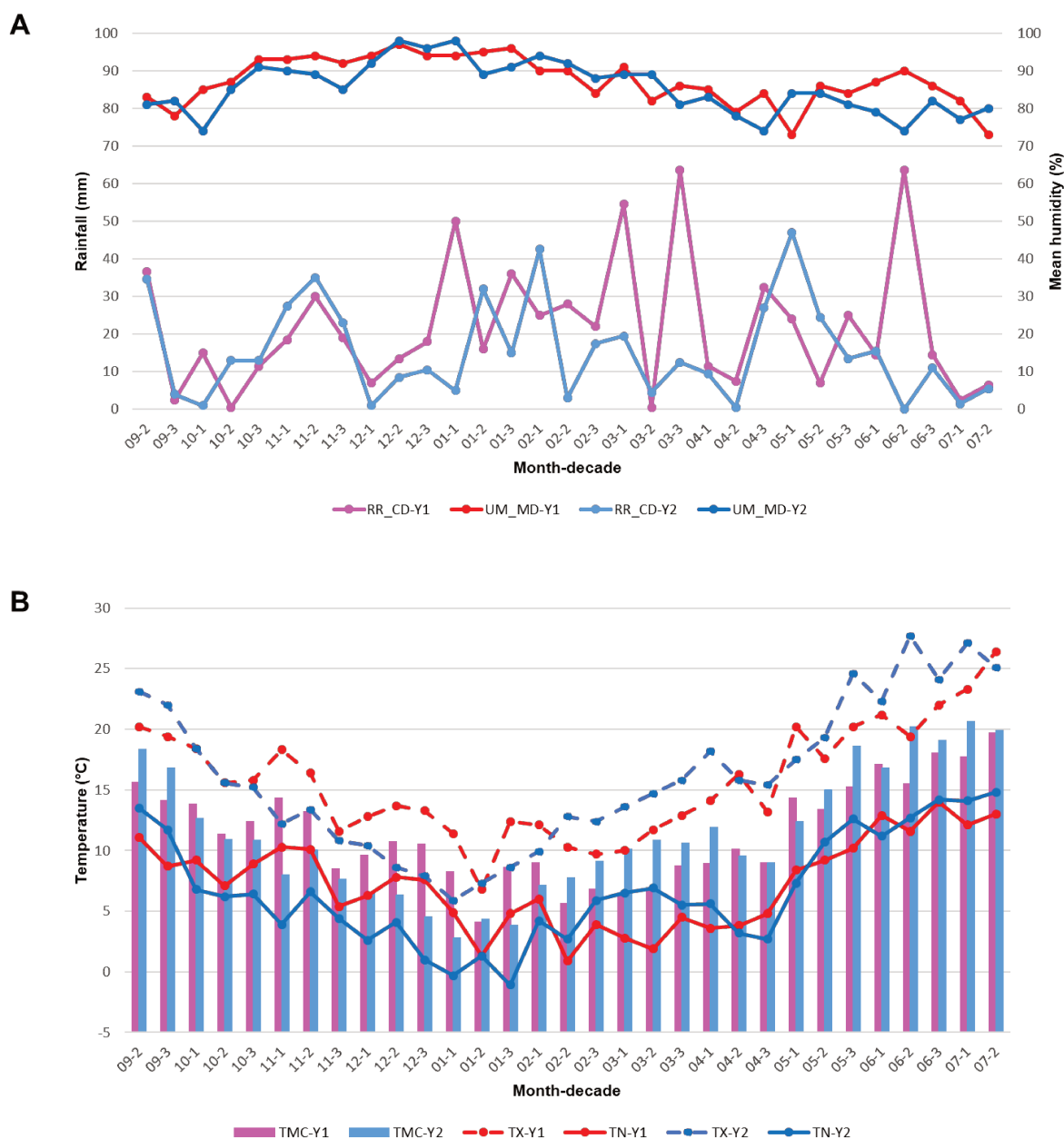


SUPPLEMENTAL DATA



**Figure S1.** Distribution of the 116 genotypes representing the diversity of WOSR in Western Europe, among the 5 WOSR genetic groups. Cultivars were genotyped using 628 SNP (Clarke *et al.*, 2016). The structure of the collection was studied using ADMIXTURE (Alexander *et al.*, 2009). Each genetic group is represented with a colour. A cultivar belongs to the group of which the colour is majority. The 9 selected genotypes of the study are marked with a yellow star.

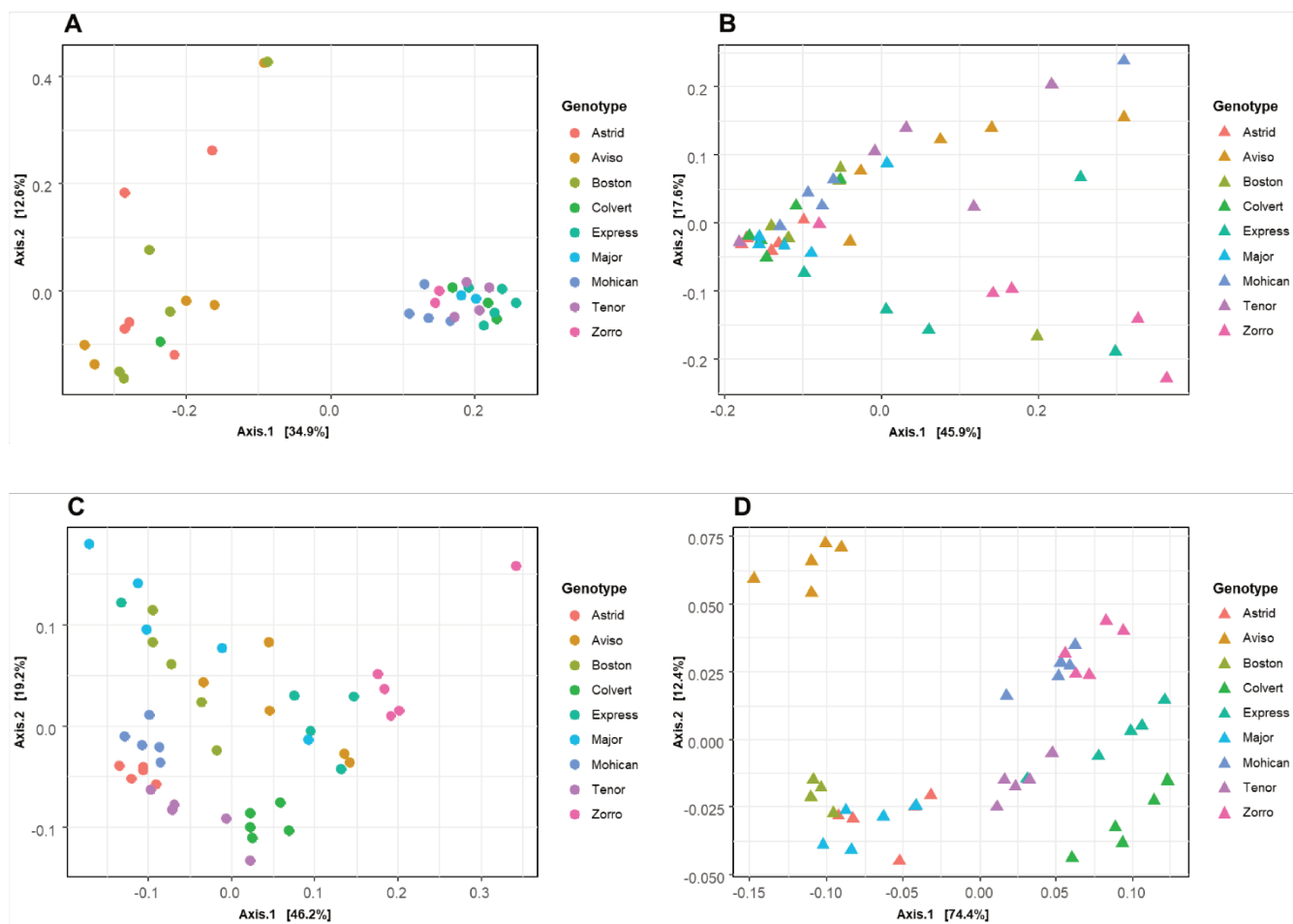




**Figure S2.** Climatic data for the cropping periods Y1 and Y2. (A) Rainfall level in mm (RR-DC) and mean humidity in % (UM-MD). (B) Mean calculated temperature (TMC), minimal (TN) and maximal (TX) temperatures in °C. All data are reported for 10 days (decade) during the years 2015-2016 (Y1) and 2016-2017 (Y2) from records at Le Rheu station 35240002 – La Grande-Verrière – (48,113°N, -1,781°E) (INRA Agroclim network).

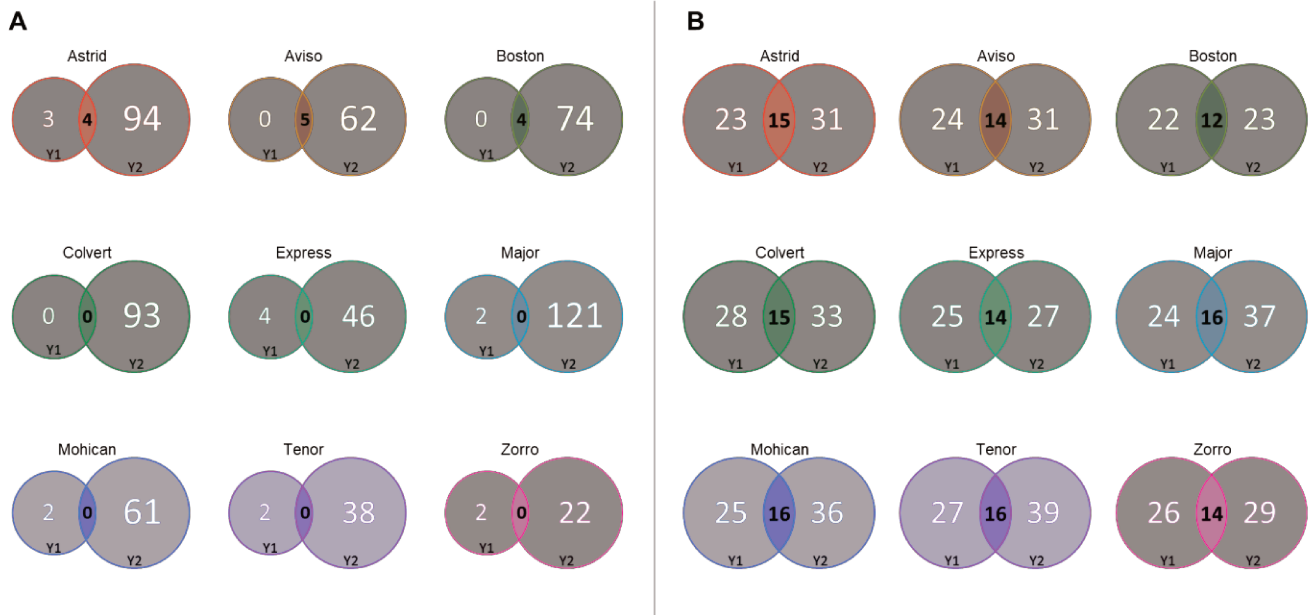






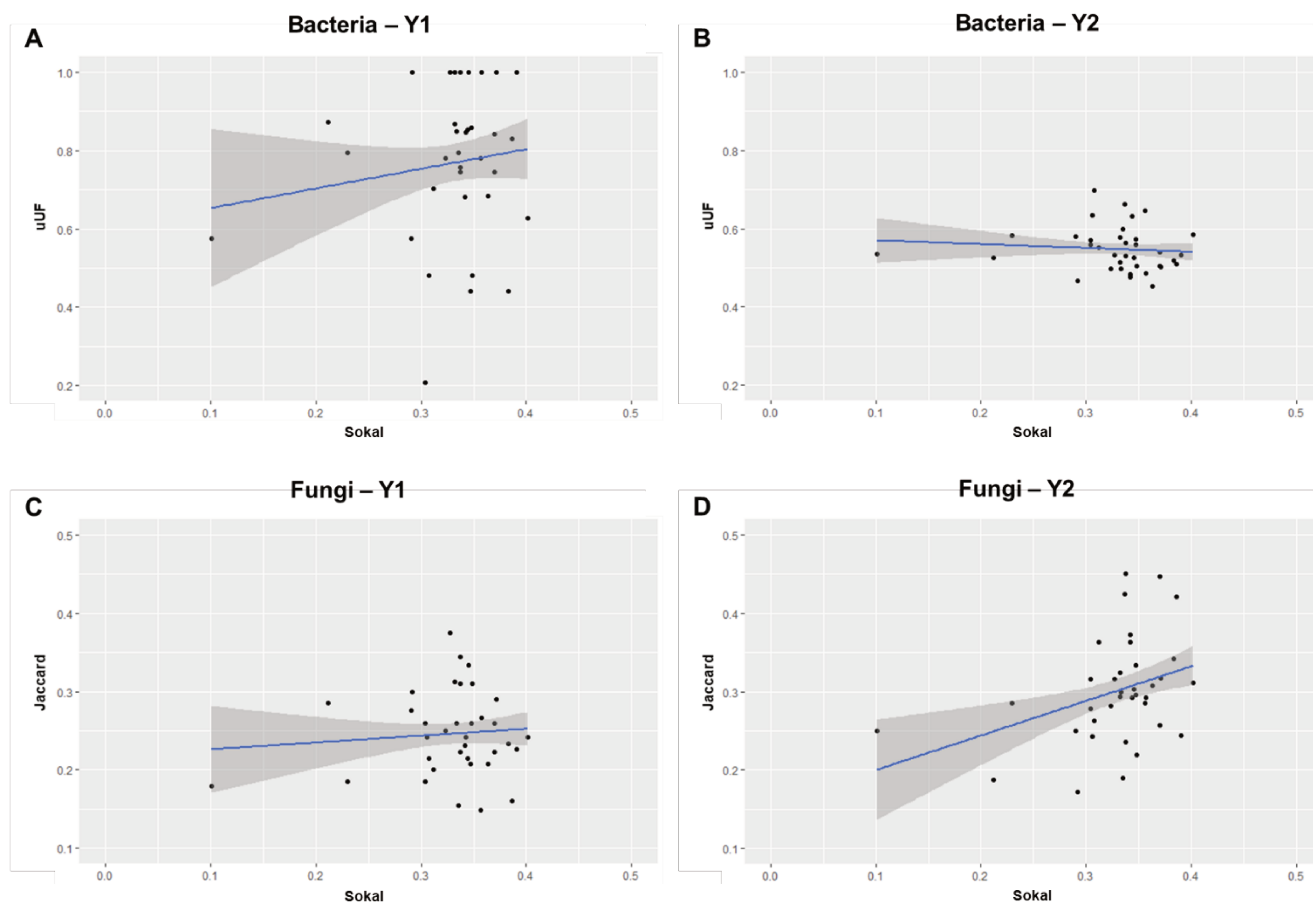
**Figure S3.** Similarities in microbial composition between *B. napus* genotypes seed-associated microbial assemblages, per year. Similarities in seed microbial composition were estimated with weighted UniFrac distance (A, B) and Bray-Curtis index (C, D) for bacterial and fungal assemblages, respectively. Principal coordinate analysis (PCoA) was used for ordination of weighted UniFrac distance and Bray-Curtis index. Samples are colored according to their genotypes, while shape corresponded to the year (●=Y1; ▲=Y2).





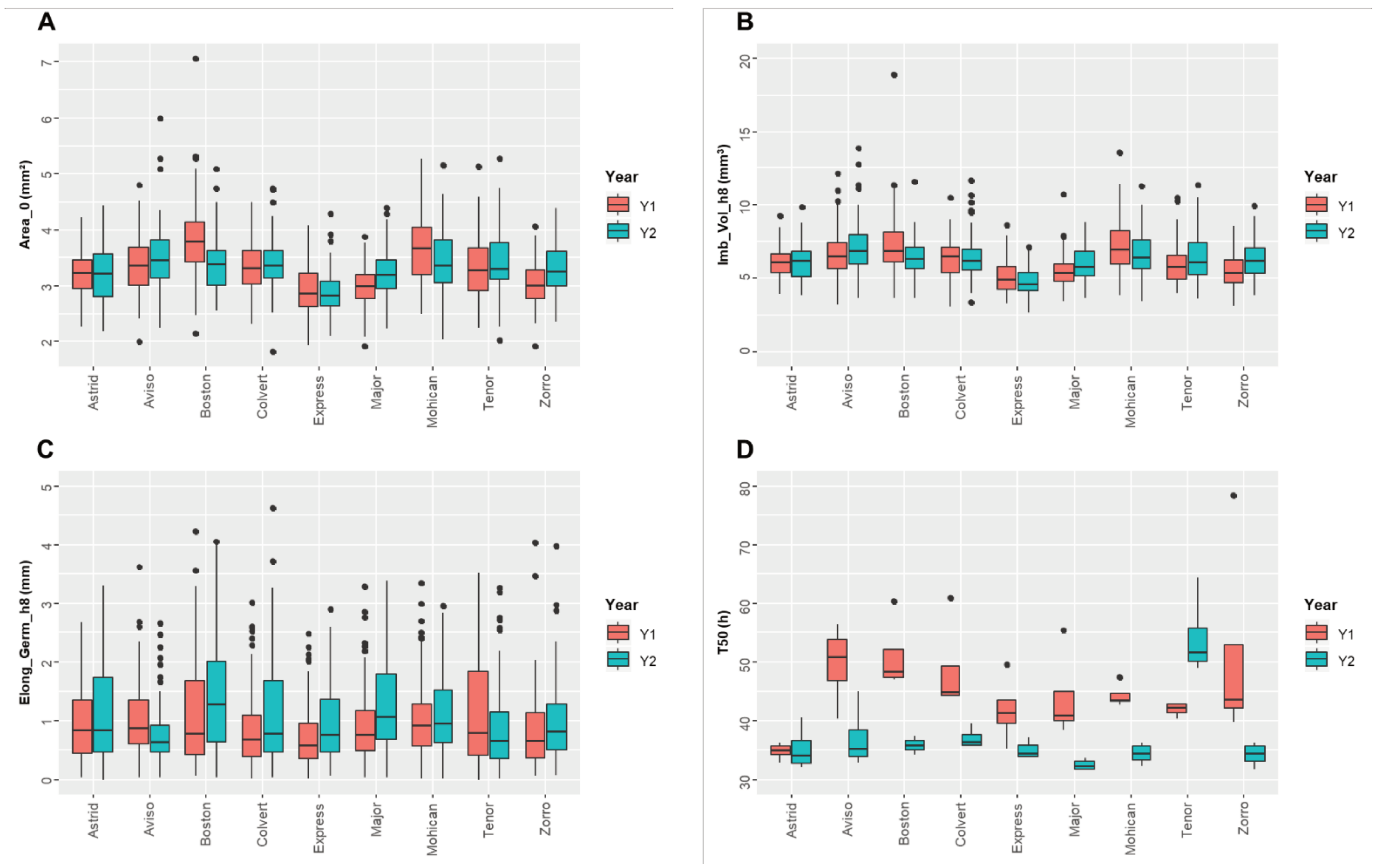
**Figure S4.** Number of bacterial (A) and fungal (B) ASVs shared between years or specific of one year, for each genotype.





**Figure S5.** Relationships between *B. napus* genetic distances and similarities of microbial assemblage compositions. The relationship between plant genotype and microbial assemblage composition was estimated by fitting a linear regression model between Sokal-Michener genetic distance and unweighted UniFrac distance (bacteria; A, B) or Jaccard index (fungi; C, D) for Y1 (A, C) and Y2 (B, D).





**Figure S6.** Different phenotyping parameters calculated for seeds of each year and genotype. (A) Seed surface at initial time; (B) Seed imbibition 8h after initiation of imbibition; (C) Radicle elongation 8h after initiation of germination; (D) Time at which a half of the seeds have germinated. Significant results are marked with a red star.





**Table S1.** Characteristics of the nine *B. napus* genotypes. Quality: 00 or ++ is for absence or presence of Glucosinolate-Erucic acid. WOSR groups are defined from the genetic diversity study of 116 WOSR accessions with 628 SNPs (Fig. S1).

<b>Name</b>	<b>Quality</b>	<b>Year of creation</b>	<b>Breeder (country)</b>	<b>WOSR genetic group</b>
Astrid	00	2003	Euralis (UK )	4
Aviso	00	2000	Danisco (France)	5
Boston	00	2000	Limagrain (UK)	1
Colvert	00	1997	Limagrain (UK)	4
Express	00	1993	NPZ (Germany)	2
Major	++	1977	INRA (France)	2
Mohican	00	1995	Euralis (France)	5
Tenor	00	1999	Momont/Limagrain (France)	1
Zorro	00	1994	NPZ (Germany)	2



**Table S2.** Cropping conditions for the *B. napus* seed production.

Location of INRA fields in Le Rheu, France			
Years	Year code	GPS coordinates	
2012-2013	Y0	48°06'36.29"N	1°46'22.04"O
2015-2016	Y1	48°06'40.86"N	1°46'26.08"O
2016-2017	Y2	48°06'37.21"N	1°47'07.98"O

Distance between fields in meters			
	Y0 <sup>1</sup>	Y1	Y2
<b>Y0</b>	0		
<b>Y1</b>	170	0	
<b>Y2</b>	966	860	0

Cropping history					
Years	Year code	WOSR Genotypes	Sowing date	Date of self-pollination bag attach <sup>2</sup>	Harvest date
<b>2015-2016</b>	Y1				
		Astrid	11/09/2015	04/04/2016	15/07/2016
		Aviso	11/09/2015	10/04/2016	15/07/2016
		Boston	11/09/2015	10/04/2016	15/07/2016
		Colvert	11/09/2015	07/04/2016	15/07/2016
		Express	11/09/2015	07/04/2016	15/07/2016
		Major	11/09/2015	10/04/2016	15/07/2016
		Mohican	11/09/2015	08/04/2016	15/07/2016
		Tenor	11/09/2015	10/04/2016	15/07/2016
		Zorro	11/09/2015	10/04/2016	15/07/2016
<b>2016-2017</b>	Y2				
		Astrid	22/09/2016	04/04/2017	04/07/2017
		Aviso	22/09/2016	07/04/2017	04/07/2017
		Boston	22/09/2016	07/04/2017	04/07/2017
		Colvert	22/09/2016	05/04/2017	04/07/2017
		Express	22/09/2016	05/04/2017	04/07/2017
		Major	22/09/2016	07/04/2017	04/07/2017
		Mohican	22/09/2016	05/04/2017	04/07/2017
		Tenor	22/09/2016	06/04/2017	04/07/2017
		Zorro	22/09/2016	06/04/2017	04/07/2017

<sup>1</sup>Self-pollination with cages of 1.80 m height, 0.65 m diameter, covered with a polyester veil, Lenglard, France<sup>2</sup>30x70 mm bags ref SM570Y, Sealed air Cryovac, France



**Table S3.** Genotype-specific bacterial and fungal ASVs for Y1.

Genotype	Bacterial ASVs			Fungal ASVs		
	ASV	Taxonomy	Ab (log10)	ASV	Taxonomy	Ab (log10)
Astrid	ASV00217	<i>Sphingomonas</i>	2.6	-	-	-
	ASV00220	<i>Sphingomonas</i>	3	-	-	-
	ASV00704	<i>Sphingomonas</i>	2.3	-	-	-
Aviso	ASV00047	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
Boston	ASV00046	<i>Frigoribacterium</i>	3.1	-	-	-
	ASV00178	<i>Sphingomonas</i>	2.8	-	-	-
Colvert	-	-	-	ASV0037	<i>Sclerotinia</i>	4
	-	-	-	ASV0047	<i>Cryptococcus</i>	3.4
	-	-	-	ASV0043	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	2.9
Express	ASV00993	<i>Comamonadaceae</i>	2.6	-	-	-
Major	-	-	-	-	-	-
Mohican	-	-	-	ASV0023	<i>Holtermanniales</i>	2.8
	-	-	-	ASV0076	<i>Entylomatales</i>	2.3
Tenor	ASV00020	<i>Propionibacterium acnes</i>	2.7	ASV0062	<i>Cryptococcus victoriae</i>	3.3
Zorro	-	-	-	-	-	-



**Table S4.** Genotype-specific bacterial and fungal ASVs for Y2.

Genotype	Bacterial ASVs			Fungal ASVs		
	ASV	Taxonomy	Ab (log <sub>10</sub> )	ASV	Taxonomy	Ab (log <sub>10</sub> )
Astrid	ASV00004	<i>Pantoea agglomerans</i>	4.2	-	-	-
	ASV00014	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	3.7	-	-	-
	ASV00100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.0	-	-	-
	ASV00216	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.4	-	-	-
	ASV00243	<i>Microbacteriaceae</i>	3.3	-	-	-
	ASV00268	<i>Pseudomonas</i>	3.4	-	-	-
	ASV00300	<i>Sphingomonas</i>	3.4	-	-	-
	ASV00309	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.4	-	-	-
	ASV00330	<i>Sphingomonas</i>	3.2	-	-	-
	ASV00339	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00446	<i>Sphingomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00457	<i>Sphingomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00482	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.1	-	-	-
	ASV00510	<i>Frigoribacterium</i>	3.0	-	-	-
	ASV00637	<i>Sphingomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00709	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.8	-	-	-
	ASV00724	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.8	-	-	-
	ASV00782	<i>Sphingomonas</i>	2.6	-	-	-
	ASV00804	<i>Sanguibacter keddieii</i>	2.7	-	-	-
	ASV00933	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.5	-	-	-
ASV00944	<i>Actinobacteria</i>	2.6	-	-	-	
ASV00995	<i>Sphingomonas</i>	2.5	-	-	-	
ASV01202	<i>Sphingomonas</i>	2.5	-	-	-	
Aviso	ASV00016	<i>Pseudomonas</i>	4.9	ASV0089	<i>Alternaria infectoria</i>	2.9
	ASV00018	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	4.9	ASV0114	<i>Alternaria infectoria</i>	2.6
	ASV00068	<i>Pantoea agglomerans</i>	3.1	-	-	-
	ASV00110	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	3.1	-	-	-
	ASV00164	<i>Pseudomonas</i>	3.6	-	-	-
	ASV00285	<i>Rhizobium</i>	3.4	-	-	-
	ASV00297	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00410	<i>Pseudomonas proteolytica</i>	3.2	-	-	-
	ASV00424	<i>Sphingomonas</i>	3.0	-	-	-
	ASV00449	<i>Pseudomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00493	<i>Sphingomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00540	<i>Curtobacterium</i>	3.0	-	-	-
	ASV00653	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.9	-	-	-
	ASV00673	<i>Frigoribacterium</i>	2.8	-	-	-
	ASV00697	<i>Actinobacteria</i>	2.8	-	-	-
	ASV00737	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.8	-	-	-
	ASV01479	<i>Frigoribacterium</i>	2.3	-	-	-
ASV01639	<i>Sphingomonas</i>	2.2	-	-	-	
Boston	ASV00030	<i>Erwinia billingiae</i>	4.6	-	-	-
	ASV00062	<i>Pseudomonas</i>	3.7	-	-	-
	ASV00064	<i>Pseudomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00085	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	3.6	-	-	-
	ASV00108	<i>Pseudomonas</i>	4.0	-	-	-
	ASV00137	<i>Pseudomonas</i>	3.8	-	-	-
	ASV00193	<i>Rhizobium</i>	3.4	-	-	-
	ASV00197	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.7	-	-	-
	ASV00202	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.7	-	-	-





Chapitre I – Microbiote des graines de colza

	ASV00214	<i>Massilia</i>	3.6	-	-	-
	ASV00215	<i>Rhizobium</i>	3.4	-	-	-
	ASV00244	<i>Rahnella aquatilis</i>	2.8	-	-	-
	ASV00283	<i>Rhizobium</i>	3.4	-	-	-
	ASV00302	<i>Rhizobium</i>	3.2	-	-	-
	ASV00358	<i>Rhizobium</i>	3.3	-	-	-
	ASV00438	<i>Pseudomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00473	<i>Sphingomonas</i>	3.0	-	-	-
	ASV00491	<i>Pseudomonas</i>	2.6	-	-	-
	ASV00523	<i>Sphingomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00524	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.0	-	-	-
	ASV00531	<i>Comamonadaceae</i>	3.0	-	-	-
	ASV00573	<i>Sphingomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00610	<i>Rhizobium</i>	2.9	-	-	-
	ASV00903	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.6	-	-	-
	ASV01010	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.5	-	-	-
	ASV01142	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.5	-	-	-
	ASV01318	<i>Morganella morganii</i>	2.4	-	-	-
	ASV01439	<i>Microbacterium</i>	2.2	-	-	-
Colvert	ASV00034	<i>Pseudomonas</i>	3.3	ASV0076	<i>Entylomatales</i>	2.0
	ASV00200	<i>Pseudomonas</i>	3.6	-	-	-
	ASV00207	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00227	<i>Sphingomonas</i>	3.6	-	-	-
	ASV00270	<i>Rhizobium</i>	3.5	-	-	-
	ASV00296	<i>Sphingomonas</i>	3.4	-	-	-
	ASV00321	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.0	-	-	-
	ASV00347	<i>Rhodobacteraceae</i>	3.3	-	-	-
	ASV00364	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00377	<i>Sphingomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00392	<i>Frigoribacterium</i>	3.2	-	-	-
	ASV00432	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.2	-	-	-
	ASV00483	<i>Sphingomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00549	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.0	-	-	-
	ASV00557	<i>Sphingomonas</i>	3.0	-	-	-
	ASV00612	<i>Sphingomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00615	<i>Rhizobium</i>	2.6	-	-	-
	ASV00664	<i>Methylobacterium</i>	2.8	-	-	-
	ASV00736	<i>Sphingomonadaceae</i>	2.7	-	-	-
	ASV00829	<i>Frigoribacterium</i>	2.7	-	-	-
	ASV01320	<i>Frigoribacterium</i>	2.4	-	-	-
	ASV01377	<i>Rhizobiales</i>	2.3	-	-	-
Express	ASV00037	<i>Pseudomonas</i>	3.0	-	-	-
	ASV00326	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00371	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00403	<i>Sphingomonas</i>	3.0	-	-	-
	ASV00525	<i>Sphingomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00535	<i>Sphingomonas</i>	3.0	-	-	-
	ASV00608	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.9	-	-	-
Major	ASV00017	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.4	ASV0037	<i>Sclerotinia</i>	2.6
	ASV00128	<i>Sphingomonas</i>	3.0	ASV0047	<i>Cryptococcus</i>	2.9
	ASV00252	<i>Rhodococcus</i>	3.4	ASV0135	<i>Ulocladium chartarum</i>	2.0
	ASV00253	<i>Sphingomonas</i>	3.5	-	-	-
	ASV00261	<i>Sanguibacter keddiei</i>	2.5	-	-	-
	ASV00273	<i>Variovorax</i>	3.1	-	-	-
	ASV00275	<i>Rhizobium</i>	3.1	-	-	-



Chapitre I – Microbiote des graines de colza

	ASV00284	<i>Sphingomonas</i>	3.4	-	-	-
	ASV00303	<i>Sphingomonas</i>	3.2	-	-	-
	ASV00322	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00332	<i>Sphingomonas</i>	3.3	-	-	-
	ASV00363	<i>Methylobacterium</i>	3.3	-	-	-
	ASV00379	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3.0	-	-	-
	ASV00389	<i>Sphingomonas</i>	3.2	-	-	-
	ASV00397	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.2	-	-	-
	ASV00404	<i>Sphingomonas</i>	3.1	-	-	-
	ASV00490	<i>Microbacteriaceae</i>	3.0	-	-	-
	ASV00506	<i>Pseudomonas</i>	2.6	-	-	-
	ASV00515	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.0	-	-	-
	ASV00572	<i>Sphingomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00579	<i>Microbacteriaceae</i>	2.9	-	-	-
	ASV00588	<i>Rhizobium</i>	2.8	-	-	-
	ASV00603	<i>Sphingomonas</i>	2.9	-	-	-
	ASV00621	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.9	-	-	-
	ASV00685	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.8	-	-	-
	ASV00727	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.8	-	-	-
	ASV00730	<i>Methylibium</i>	2.8	-	-	-
	ASV00738	<i>Sphingomonas</i>	2.8	-	-	-
	ASV00745	<i>Sphingomonas</i>	2.8	-	-	-
	ASV00773	<i>Sphingomonas</i>	2.7	-	-	-
	ASV00863	<i>Actinobacteria</i>	2.7	-	-	-
	ASV00875	<i>Frigoribacterium</i>	2.7	-	-	-
	ASV00916	<i>Clavibacter michoganensis</i>	2.6	-	-	-
	ASV00947	<i>Sphingomonas</i>	2.6	-	-	-
	ASV00966	<i>Alphaproteobacteria</i>	2.6	-	-	-
	ASV01070	<i>Oxalobacteraceae</i>	2.5	-	-	-
	ASV01327	<i>Curtobacterium</i>	2.4	-	-	-
	ASV01608	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.2	-	-	-
Mohican	ASV00044	<i>Pseudomonas lurida</i>	3.3	ASV0081	<i>Alternaria infectoria</i>	3.0
	ASV00054	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3.0	ASV0110	<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	2.6
	ASV00122	<i>Pseudomonas</i>	3.9	-	-	-
	ASV00239	<i>Agrobacterium</i>	3.2	-	-	-
	ASV00368	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.3	-	-	-
	ASV00375	<i>Actinobacteria</i>	3.3	-	-	-
	ASV00414	<i>Sphingomonas</i>	3.2	-	-	-
	ASV00562	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.0	-	-	-
	ASV00633	<i>Actinomycetales</i>	2.7	-	-	-
	ASV00639	<i>Actinomycetales</i>	2.8	-	-	-
	ASV00668	<i>Actinomycetales</i>	2.8	-	-	-
	ASV00743	<i>Rhizobiales</i>	2.7	-	-	-
	ASV00865	<i>Sphingomonas</i>	2.6	-	-	-
	ASV01174	<i>Hymenobacter</i>	2.4	-	-	-
	ASV01574	<i>Sphingomonas</i>	2.3	-	-	-
Tenor	ASV00022	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.7	ASV0080	<i>Alternaria infectoria</i>	3.0
	ASV00289	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	3.2	ASV0083	<i>Pleosporaceae</i>	3.0
	ASV00562	<i>Oxalobacteraceae</i>	3.0	ASV0093	<i>Alternaria infectoria</i>	2.8
	-	-	-	ASV0100	<i>Alternaria triticina</i>	2.7
	-	-	-	ASV0108	<i>Alternaria</i>	2.6
Zorro	ASV00070	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.2	ASV0086	<i>Pleosporaceae</i>	2.9



# CHAPITRE II

---

**COALESCENCE ASYMETRIQUE ENTRE LE MICROBIOTE DES  
GRAINES ET LE MICROBIOTE DU SOL AU COURS DES PREMIERS  
STADES DE DEVELOPPEMENT DE LA PLANTE**

---



## CHAPITRE II : COALESCENCE ASYMETRIQUE ENTRE LE MICROBIOTE DES GRAINES ET LE MICROBIOTE DU SOL AU COURS DES PREMIERS STADES DE DEVELOPPEMENT DE LA PLANTE

---

### PRESENTATION DU CHAPITRE

Dans ce second chapitre, l'objectif était d'étudier si le microbiote de la graine participe à l'assemblage des communautés microbiennes associées à la plante. Les résultats obtenus dans le chapitre précédent nous ont permis de sélectionner quatre lots de graines (2 géotypes x 2 années de récolte) aux microbiotes contrastés, afin de traiter cette question. Nous avons choisi de travailler dans un sol vivant en faisant varier sa diversité microbienne (un sol de forte diversité et un sol de plus faible diversité). Le sol étant le premier environnement que rencontre la graine au semis et dans lequel elle entre en germination, nous avons voulu estimer l'impact relatif des microbiotes du sol et de la graine sur l'assemblage des communautés microbiennes de la plantule. A l'heure actuelle, il existe peu de connaissances sur la persistance du microbiote des graines et son influence sur l'assemblage du microbiote lors des premiers stades de développement des plantes. Ici, nous avons étudié les événements de coalescence entre le microbiote des graines et celui du sol au cours de la croissance des jeunes plantes. Par métabarcoding, nous avons étudié les communautés bactériennes et fongiques des tiges et des racines des quatre lots de colza 7 jours et 14 jours après le semis, et évaluer l'importance relative des facteurs géotype de l'hôte, diversité du microbiote de graine, diversité du microbiote du sol dans la structuration des communautés de la plantule. Ainsi, au cours de cette étude nous avons exploré trois questions :

- (i) Quelle est la principale source de transmission microbienne pour les plantules ?
- (ii) La composition du microbiote des semences et la diversité du sol ont-elles un impact sur l'assemblage du microbiote des plantules ?
- (iii) L'abondance initiale du taxon dans la source influence-t-elle le succès de sa transmission ?

Les résultats obtenus dans cette seconde étude font l'objet d'un article scientifique en cours de préparation, qui sera soumis prochainement.





**Asymmetric outcome of community coalescence between  
seed and soil microbiota during early seedling growth**

**Authors:** Aude Rochefort<sup>1</sup>, Marie Simonin<sup>2</sup>, Coralie Marais<sup>2</sup>, Anne-Yvonne Guillerm-Erckelboudt<sup>1</sup>, Matthieu Barret<sup>2</sup> et Alain Sarniguet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRAE, Agrocampus-Ouest, Université de Rennes 1, UMR 1349 IGEPP, Le Rheu, France

<sup>2</sup>INRAE, Agrocampus-Ouest, Université d'Angers, UMR 1345 IRHS, SFR4207 QuaSaV, Beaucozéz, France

**Abstract:**

Seed microbial community constitutes a primary inoculum for plant microbiota assembly. Still, the persistence of seed microbiota when seeds encounter soil during plant emergence and early growth is barely documented. Here, we characterized the interchange event or coalescence of seed and soil microbiota and how it structured seedling bacterial and fungal communities. We performed eight contrasted coalescence events to identify drivers influencing seedling microbiota assembly: four seed lots of two *Brassica napus* genotypes were sown in two soils of contrasted diversity. We found that seedling root and stem microbiota were influenced by soil diversity but not by initial seed microbiota composition. A strong selection on the two-source communities occurred during microbiota assembly, with only 8-32% of soil taxa and 0.8-1.4% of seed-borne taxa colonizing seedlings. The recruitment of seedling microbiota came mainly from soil (35-72% of diversity) and not from seeds (0.3-15%). The outcome of seed and soil microbiota coalescence is therefore strongly asymmetrical with a dominance of soil taxa. Interestingly, seedling microbiota was primarily composed of initially rare taxa (from seed, soil or unknown origin) and sub-dominant soil taxa. Our results suggest that plant microbiome engineering success based on native seed or soil microbiota will rely on rare and sub-dominant taxa in source communities.

**Keywords:** microbiota, coalescence, seed, root, stem, soil, *Brassica napus*



## INTRODUCTION

Plants live in complex associations with a wide variety of microorganisms that can modulate their fitness (Panke-Buisse *et al.*, 2015; Herrera Paredes *et al.*, 2018; Kwak *et al.*, 2018). The plant microbiota is mainly acquired horizontally through different environmental sources including soil (Lundberg *et al.*, 2012), air (Abdelfattah *et al.*, 2019), rainfall (Morris & Kinkel, 2002) and insects (Flury *et al.*, 2019). However, some members of the plant microbiota are also acquired vertically through vegetative propagation (Vannier *et al.*, 2018) or sexual reproduction *via* seeds (Shade *et al.*, 2017).

In spermatophyte, seed-associated microbial community constitutes the primary inoculum for the next plant generation (Newcombe *et al.*, 2018). The seed microbiota can have a crucial role for crop installation by modulating dormancy (McPhail *et al.*, 2010; Chahtane *et al.*, 2018), germination (Rodrigues Pereira *et al.*, 1972; Goggin *et al.*, 2015), seedling development (Verma *et al.*, 2017; Khalaf & Raizada, 2018; Walitang *et al.*, 2018) and recruitment of plant symbionts (Ridout *et al.*, 2019). Seed transmission of some specific plant-beneficial or phytopathogenic microbial strains is well documented (Darrasse *et al.*, 2010; Dutta *et al.*, 2012; Vázquez-de-Aldana *et al.*, 2013; Bertolini *et al.*, 2015; Mitter *et al.*, 2017). However, little knowledge is available on the fraction of the plant microbiota that is acquired through seeds. Pioneer studies indicate that a fraction of seed microbiota persists during germination and emergence and actively colonizes seedlings (Barret *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Torres-Cortés *et al.*, 2018). Still, most of these studies have yet been carried out in gnotobiotic conditions in absence of other environmental sources, like soil.

The encounter between two microbial communities and how they then evolve together has been called community coalescence (Rillig *et al.*, 2015, 2016; Rocca *et al.*, 2020). The outcomes of community coalescence can vary in a continuum between two categories from symmetric to asymmetric outcomes (Castledine *et al.*, 2020). In symmetrical outcomes, the initial communities contribute quite equally to the resultant coalesced community, whereas in asymmetrical outcomes one initial community becomes dominant if considering the prevalence of the members. In several coalescence studies, there is a resident advantage associated to mass effects because this resident community is more abundant, and due to priority effects because the resident members monopolize the resources and space making them unavailable to the introduced community (De



Meester *et al.*, 2016). Another advantage of the resident community is linked to its local adaptation to the reception niche (Sprockett *et al.*, 2018; Morella *et al.*, 2020).

To date, seed or soil microbiota have been extensively studied in isolation but their coalescence, the assembly mechanisms at play remain broadly unexplored and their coalescence type remains to be characterized. Seed and soil coalescence present a singular situation if the seedling community is considered as the outcome community. The seed community is extremely reduced in terms of abundance compared to soil community, but its members have potentially a 'home advantage' as they have been selected by the plant. We therefore hypothesized that despite its lower microbial richness and diversity, seed microbiota being already present and more adapted to the plant environment, would benefit from priority effects over soil microbiota for the colonization of plant compartments (Ridout *et al.*, 2019). Nevertheless, adaptation to seed does probably not recover all features for adaptation to a growing seedling. The initial soil microbial diversity level is probably another key driver of seedling microbiota and persistence of seed-borne microbial taxa. Indeed, we propose that a soil of high microbial diversity would induce a weaker colonization of the seed microbiota on seedlings due to stronger competition and higher functional redundancy in this soil (Mallon *et al.*, 2015b).

In the present work, we monitored the outcome of seed and soil communities coalescence during early seedling growth. More specifically, we investigated *(i)* what is the main source of microbial transmission to seedlings; *(ii)* does seed microbiota composition and soil diversity impact the assembly of seedling microbiota; and *(iii)* does the initial taxa abundance in the source influence its transmission success? To answer these questions, we selected seed lots of different genotypes of the winter oilseed rape *Brassica napus*, which harbored contrasting seed microbiota (Rochefort *et al.*, 2019). Seeds were sown in two soils of different microbial diversities and the output structure of microbiota diversity (bacteria and fungi) was described by amplicon sequencing on roots and stems sampled at different seedling growing stages. This study gains new insights into the soil and plant drivers that influence the coalescence of soil and seed microbiota during the first steps of seedling microbiota assembly.



## MATERIALS AND METHODS

### Soil preparation

In 2014, soil was sampled at a depth of 10-30 cm in a 20-year wheat experimental plot (La Gruche, Pacé, France, 48°08'24.5"N 1°48'01.0"W). Soil was sterilized and recolonized with two levels of soil microbial diversity, according to the experimental procedure described in Lachaise et al. (2017). In short, a fraction of the soil sample was ground and sieved at 2 mm. Three sub-samples (900 g each) were soaked in 8L of sterile water. The resulting soil suspensions were 1:10 serially diluted in sterile water up to the  $10^{-6}$ . Another fraction (~80 kg) of the soil sample was ground, sieved at 4 mm and mixed with 1/3 washed sand. This soil was dispatched in 2.5 kg bags and sterilized with gamma ray ionization (35 kGy, Ionisos). Each bag was inoculated with 320 mL of undiluted or  $10^{-6}$  or soil suspensions, therefore resulting in soil with high and low microbial diversity, respectively. The soil recolonization was repeated 3 times (A, B, C). The bags were mixed and aerated in sterile conditions twice a week during the 39 incubation days at 20°C, to homogenize gaseous exchanges and recolonization. Microbial recolonization dynamics of soil was monitored by sampling 30g of soil at several times. For bacteria, each sample was serially diluted and plated on 1/10 strength Tryptic Soy Agar (17 g.L<sup>-1</sup> tryptone, 3 g.L<sup>-1</sup> soybean peptone, 2.5 g.L<sup>-1</sup> glucose, 5 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 5 g.L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 15 g.L<sup>-1</sup> agar) supplemented with Nystatin (0.025 g.L<sup>-1</sup>), and the number of colony-forming units was measured after 3 days of incubation at 27°C. For fungi, following the pour-plate method, serially diluted samples were mixed with molten Acid Malt Agar (10 g.L<sup>-1</sup> Malt extract, 15 g.L<sup>-1</sup> agar and 0.25 g.L<sup>-1</sup> citric acid) supplemented with streptomycin (0.15 g.L<sup>-1</sup>) and penicillin (0.075 g.L<sup>-1</sup>) and the number of colony-forming units was measured after 7 days of incubation at 20°C. After 39 days of incubation, a portion of each soil (high and low diversity) in three independent repetitions (A, B, C) was collected and stored at -80°C until DNA extraction. Organic and mineral composition and pH of these samples were analyzed (INRAE, Arras, France). Differences between soil composition were considered as significant with T-test at a p-value <0.1.

### Sowing and sampling

After the 39 days of soil incubation, individual pots were filled with first a 5 mm layer of sterile vermiculite and then with 80g of each soil of different microbial diversity (High and Low). Soils were saturated in tap water by sub-imbibition one day before





sowing, in order to reach about 80% of humidity (retention capacity) on the day of sowing. During the experiment, plants were watered twice (at 5 and 12 days) with tap water.

Seed samples from two genotypes of *Brassica napus* (Boston and Major) collected during two consecutive years (Y1 and Y2) were selected for this work, resulting in four contrasted initial seed microbiota used for the coalescence experiment. At d0, seeds of each genotype and year were individually sown at a depth of 5mm and grown under controlled conditions (14h day/ 10h night period, 20°C). Seven days (d07) and fourteen days (d14) after sowing, 10 and 20 plants were sampled per modality (2 genotypes x 2 harvesting years x 2 soils), respectively. Roots were cut from stems and gently soaked 10 seconds in sterile water to remove residual soil. Otherwise, stems were size-equalized on 2cm from the root basis. Therefore, the resulting sampled root habitat was composed of the inner root and rhizoplane and the stem habitat was composed of inner stem and stem surface. The 10 (d07) or 20 (d14) roots and stems were pooled separately and stored as root and stem compartments at -80°C until DNA extraction.

#### Microbial DNA sample preparation

Seed samples were prepared for extraction as previously detailed in Rochefort et al., (2019). Briefly, seeds were soaked in phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) supplemented with Tween® 20 (0.05 % v/v, Sigma-Aldrich) during 2h30 at 4°C. DNA extraction was performed with the DNeasy PowerSoil HTP 96 Kit (Qiagen) following manufacturers procedure. Soil, root and stem samples were lyophilized before DNA extraction. Samples were mixed with 1mm and 3mm beads, and crushed 2 x 30s at 5m/s with FastPrep (MP Biomedicals). DNA extraction was performed with the DNeasy PowerSoil HTP 96 Kit.

#### Library construction and sequencing

Amplicon libraries were constructed with the primer sets gyrB\_aF64/gyrB\_aR553 (Barret *et al.*, 2015) and ITS1F/ITS2 (Buée *et al.*, 2009), following the experimental procedure previously described in Rochefort *et al.* (2019). A blank extraction kit control and a PCR-negative control were included in each PCR plate. Amplicon libraries were mixed with 10% PhiX and sequenced with two MiSeq reagent kit v3 600 cycles.



### Sequence processing

Primer sequences were removed with cutadapt version 1.8 (Martin, 2011). Fastq files were processed with DADA2 version 1.6.0 (Callahan *et al.*, 2016), using the following parameters: truncLen=c(190, 200), maxN=0, maxEE=c(1,1), truncQ=5 for *gyrB* reads. ITS1 reads were processed with the same parameters, except that reads were not trimmed to a fixed length and that truncQ was set to 2. Chimeric sequences were identified and removed with the removeBimeraDenovo function of DADA2. Taxonomic affiliations of amplicon sequence variants (ASV) were performed with a naive Bayesian classifier (Wang *et al.*, 2007) implemented in DADA2. ASVs derived from *gyrB* reads were classified with an in-house *gyrB* database (train\_set\_gyrB\_v4.fa.gz) available upon request. ASVs derived from ITS1 reads were classified with the UNITE v7.1 fungal database (Abarenkov *et al.*, 2010).

### Microbial community analyses

Analyses of diversity were conducted with the R package Phyloseq version 1.26.0 (McMurdie & Holmes, 2013). Since the primer set *gyrB*\_aF64/*gyrB*\_aR553 can sometimes co-amplify *parE*, a paralog of *gyrB*, the *gyrB* taxonomic training data also contained *parE* sequences. Hence, ASVs affiliated to *parE* or unclassified at the phylum-level were removed. Sequences were aligned with DECIPHER 2.14.0 (Wright, 2016) and neighbor-joining phylogenetic trees were constructed with Phangorn 2.5.5 (Schliep, 2011). Identification of sequence contaminant was assessed with decontam version 1.4 (Davis *et al.*, 2018) using the “prevalence” method at a threshold of 0.1. Fungal ASVs unassigned at the phylum level were removed. For the ITS1 dataset, we created a hybrid-gene phylogenetic tree (*i.e.* ghost tree, Fouquier *et al.*, 2016) based on the 18S rRNA gene sequence database (Silva 132) and ITS database (UNITE v8) in order to perform phylogenetic analyses.

Data were normalized based on sequencing depth. For soil analyses, data were rarefied at 30,000 and 25,000 reads per sample for *gyrB* and ITS1, respectively. For plant (root and stem) analyses, data were rarefied at 1,000 reads per sample for *gyrB* and ITS1. Faith’s phylogenetic diversity was calculated on *gyrB* and ITS1 datasets with the R package picante version 1.8 (Kembel *et al.*, 2010). Differences in alpha-diversity estimators were assessed with Analysis of Variance. Differences were considered as significant at a p-value < 0.05.

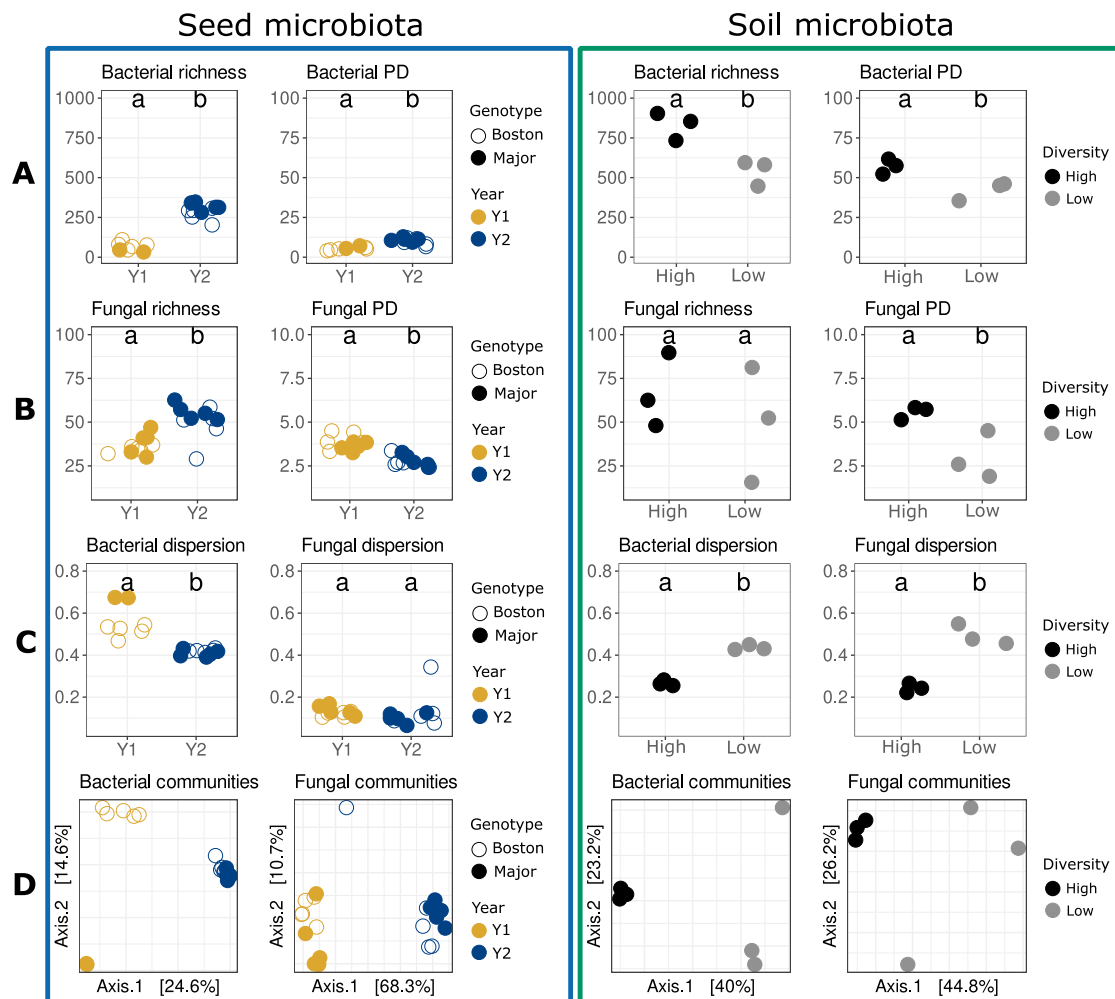


Changes in microbial community composition were assessed on  $\log_{10}+1$  transformed values with Bray-Curtis (BC) index. Principal coordinate analysis (PCoA) was used for ordination of BC index. Homogeneity of group dispersions was assessed with betadisper function of vegan 2.5.3 (Oksanen *et al.*, 2017). Difference in dispersion between groups was assessed with a Wilcoxon non-parametric test. To quantify the relative contribution of seed microbiota, soil diversity, development stage and habitat in microbial community profiles, permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001) was performed with the function adonis2 of the R package vegan 2.5.3 (Oksanen *et al.*, 2017). Presence and relative abundance of ASVs taxonomically attributed and checked after blast analysis to ammonia-oxidizing bacteria (AOB) including Nitrosomonas genus (*Nitrosospira* sp., and *Nitrosovibrio* sp.), and nitric-oxidizing bacteria (NOB) including *Nitrobacter* sp. and *Nitrospira* sp. (Santoro, 2016; Wang *et al.*, 2019a) were investigated in soils of high and low microbial diversities. Differences were considered as significant with T-test at a p-value <0.1.

### Transmission analyses

A prevalence matrix of common ASVs between seeds, soils, roots and stems was constructed on non-rarefied data. Owing to the microbial variability between individual seeds, an ASV was recorded as present if detected in at least one of the 3 seed sample repetitions. Visualization of bacterial and fungal ASVs shared between biological habitats or specific to one was assessed with the R package UpSetR 1.4.0 (Lex *et al.*, 2014).

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the SRA database under the accession number PRJEB41004.



**Figure 1: Diversity of initial seed (blue) and soil (green) microbial community pools before coalescence.** (A) Bacterial alpha-diversity. (B) Fungal alpha-diversity. (C) Microbial dispersion to centroid. (D) Microbial beta-diversity. Bacterial and fungal richness were estimated with Chao1. Bacterial and fungal phylogenetic diversities were calculated with Faith's phylogenetic diversity (PD). PCoA ordination of Bray-Curtis index was calculated for bacteria and fungi.

**Table 1: Soil physicochemical analyses and relative abundance of bacterial nitrifiers.** Values for high and low soil microbial diversities are the average of the 3 replicates  $\pm$  standard errors. T-test was performed on data, and significant p-values are indicated with an asterisk.

Soil diversity	pH	Organic carbone (C) g/kg	Total nitrogen (N) g/kg	Organic material g/kg	C/N ratio	Total calcium carbonate (CaCO <sub>3</sub> ) g/kg	Nitric nitrogen (N of NO <sub>3</sub> ) on extract 1/10 mg/kg	Ammoniacal nitrogen (N of NH <sub>4</sub> ) on extract 1/10 mg/kg	AOB (%)	NOB (%)
<b>High</b>	6.24 $\pm$ 0.03	7.30 $\pm$ 0.32	0.84 $\pm$ 0.04	12.6 $\pm$ 0.56	8.65 $\pm$ 0.20	<1	72.2 $\pm$ 0.44	1.96 $\pm$ 0.42	5.7 $\pm$ 2.7	0.25 $\pm$ 0.03
<b>Low</b>	6.89 $\pm$ 0.09	7.26 $\pm$ 0.17	0.84 $\pm$ 0.02	12.6 $\pm$ 0.31	8.61 $\pm$ 0.05	<1	29.03 $\pm$ 1.68	32.57 $\pm$ 0.93	0.5 $\pm$ 0.11	0
<b>T-test</b>	0.003*	0.87	1	0.93	0.73	1	0.0002 *	2.97.10 <sup>-5</sup> *	0.08*	0.005*

## RESULTS

### Selected seed lots have distinct microbial communities

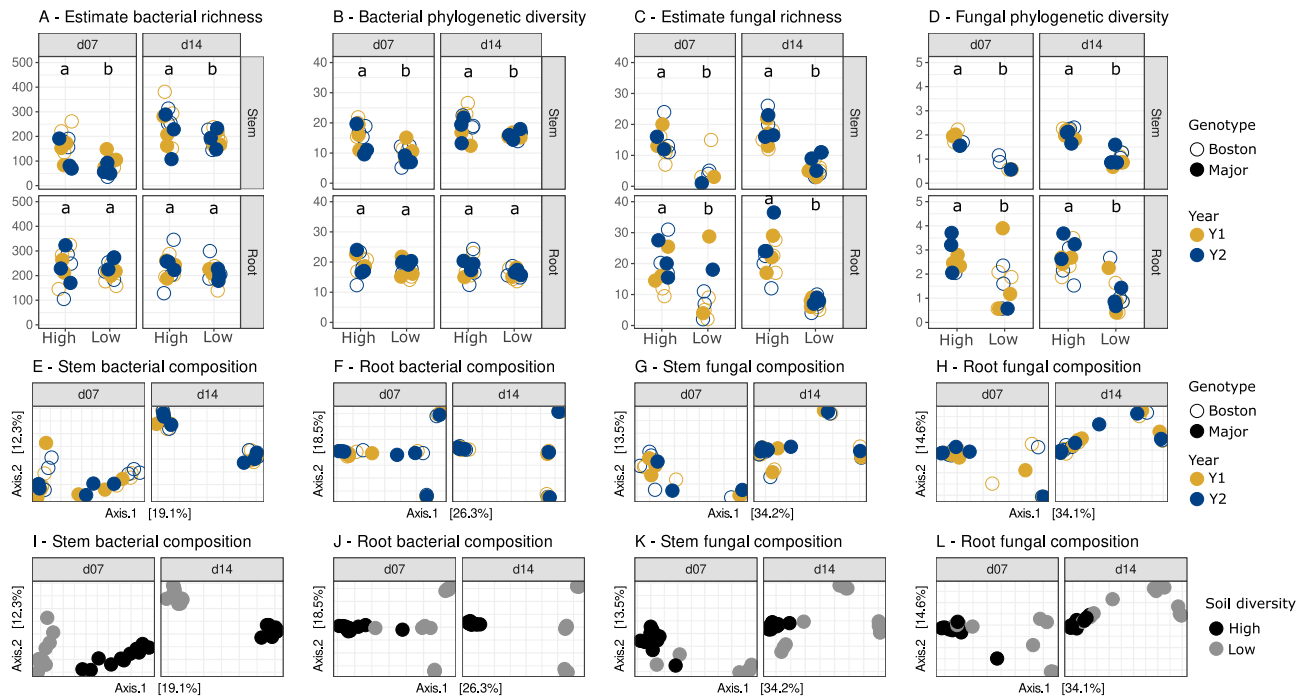
Harvesting year and plant genotypes are significant drivers of the diversity structure of the *B. napus* seed microbiota (Rocheffort *et al.*, 2019). Two *B. napus* genotypes (Boston and Major) collected during two harvest years (Y1 and Y2) were selected for this work. The most prevalent seed-borne bacterial ASVs were affiliated to *Sphingomonas* and *Frigoribacterium* genera (**Fig. S1A**). Fungal communities were mostly composed of ASVs affiliated to *Cladosporium* and *Alternaria* genera (**Fig. S1B**).

Estimated bacterial richness (Chao1) was on average at least two times higher in Y2 (250 ASVs) than in Y1 (100 ASVs) for both genotypes, and phylogenetic diversity (Faith's PD) was also significantly ( $p < 0.05$ ) higher in Y2 (**Fig. 1A**).

While estimated fungal richness was also higher in Y2 (~50 ASVs) than in Y1 (~35 ASVs), phylogenetic diversity was higher in Y1 (**Fig. 1B**). According to distance from centroid, variation in bacterial and fungal community composition (BC index) was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in Y2 in comparison to Y1 (**Fig. 1C**). Structure of microbial communities was significantly ( $p < .001$ ) impacted by harvesting year with 24% and 62% of variance explained by this factor for bacteria and fungi, respectively (**Fig. 1D**). Moreover, seed genotype was also significantly ( $p < 0.001$ , 13% of variance) impacting bacterial community composition but not fungal community composition (**Fig. 1D**). In brief, the structure of microbial communities was different between the seed lots selected for this study and harvest year was the most important driver of these changes.

### Production of soils with contrasting levels of diversity

To obtain two soils with contrasted levels of microbial diversity, gamma-irradiated soil was inoculated with undiluted and diluted soil suspensions (see Materials & Methods section for further details). After 39 days of incubation, a plateau of  $10^9$  bacterial CFU and  $10^5$  fungal CFU per gram of soil was reached for each soil (**Fig. S2**). The acidity level of low-diversity soils significantly ( $p = 0.003$ ) increased by 0.65 pH unit compared to high-diversity soil. In addition the amount of nitric nitrogen was twice as large in high-diversity soils ( $p < 0.001$ ), whereas ammoniacal nitrogen significantly ( $p < 0.001$ ) decreased (**Table 1**). Relative abundance of AOB was significantly ( $p < 0.1$ ) higher in the soil of high diversity in comparison with the soil of low diversity. Moreover, no NOB was detected in



**Figure 2: Structuration of seedling microbiota after coalescence with contrasted seed and soil microbiota.** (A, B) Bacterial alpha-diversity. (C, D) Fungal alpha diversity. (E, F, I, J) Bacterial beta-diversity in stems and roots. (G, H, K, L) Fungal beta-diversity in stems and roots. Dots are colored either by harvest year (A-H) or by soil diversity (I-L). Bacterial and fungal richness were estimated with Chao1. Bacterial and fungal phylogenetic diversities were calculated with Faith's phylogenetic diversity. PCoA ordination of Bray-Curtis index was calculated for bacteria and fungi.

**Table 2: Permutational multivariate analysis of variance on seedling roots and stems microbial beta-diversity.** Linear model was built with the adonis2 function on data separated by root or stem compartment, integrating soil diversity (high and low), sampling stages (d07 and d14), GxY (interaction between plant genotype and year), and interaction between soil and GxY. Significant values and their associated percentage of variance (R<sup>2</sup>) are in bold and followed by an asterisk (p < 0.05).

		Bacteria		Fungi	
		P-value	% of explained variance	P-value	% of explained variance
<b>Root</b>	Soil	<b>0.001 *</b>	<b>36.8</b>	<b>0.001 *</b>	<b>22.1</b>
	Stage	<b>0.001 *</b>	<b>10.2</b>	<b>0.003 *</b>	<b>8.0</b>
	GxY	0.955	-	0.999	-
	Soil:GxY	0.990	-	0.996	-
<b>Stem</b>	Soil	<b>0.001 *</b>	<b>14.6</b>	<b>0.001 *</b>	<b>24.1</b>
	Stage	<b>0.001 *</b>	<b>46.5</b>	<b>0.002 *</b>	<b>8.6</b>
	GxY	0.394	-	0.986	-
	Soil:GxY	0.695	-	0.878	-



the soil of low diversity while the soil of high diversity was composed on average of 0.25% NOB.

The most prevalent soil-borne bacterial ASVs were affiliated to *Massilia*, *Nitrosospora* and *Sphingomonas* (**Fig. S1A**). The most prevalent soil-borne fungal ASVs were affiliated to *Mortierella*, *Trichoderma* and *Exophiala* (**Fig. S1B**).

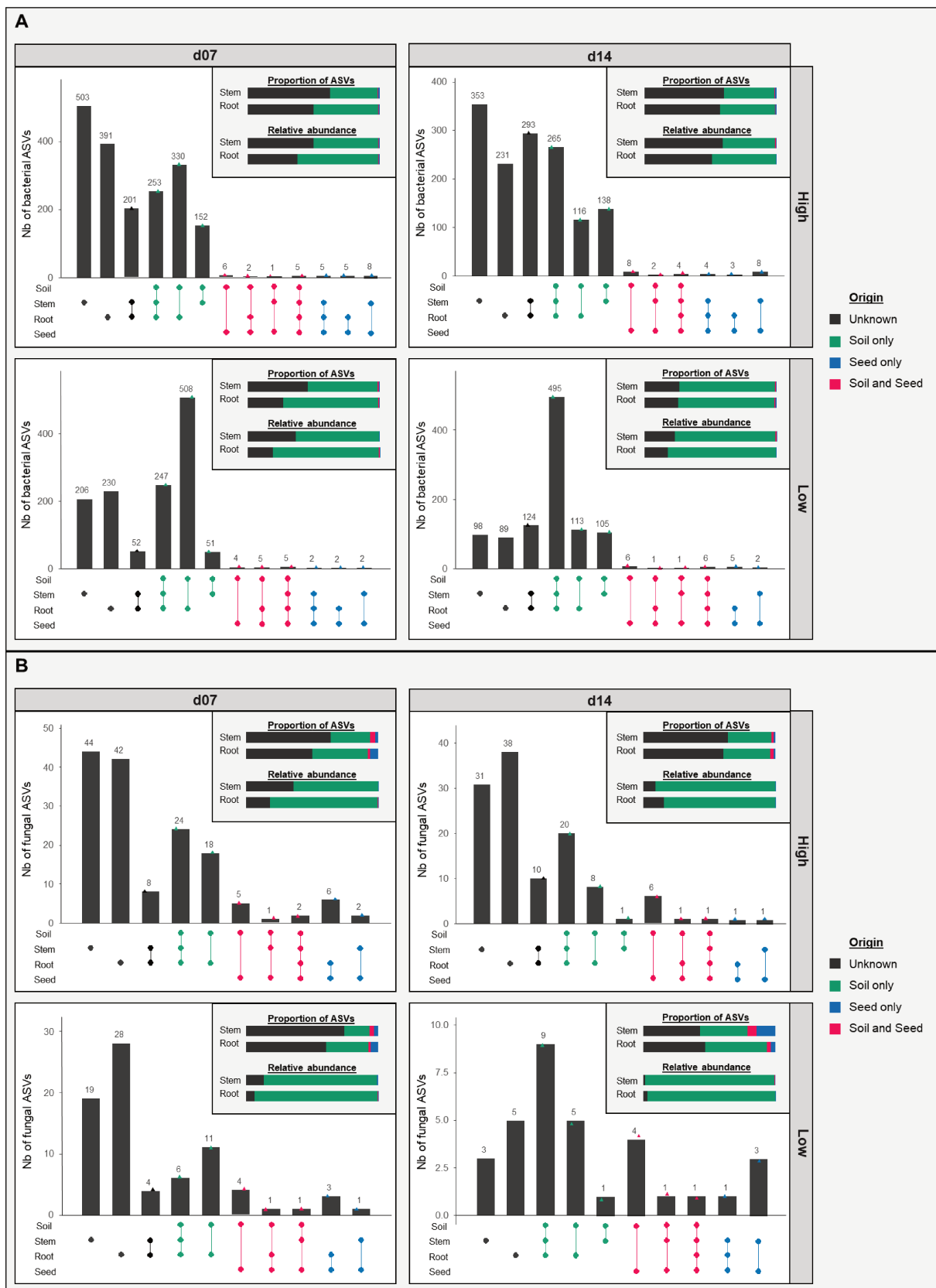
According to alpha-diversity indexes (Chao1 and Faith's index), high-diversity soils presented a higher ( $p < 0.05$ ) bacterial richness (~800 ASVs) and phylogenetic diversity compared to low-diversity soils (~500 ASVs) (**Fig. 1A**). With regard to fungal communities, only phylogenetic diversity was greater in high-diversity soils (**Fig. 1B**). Variation in microbial community composition was more important for low-diversity soils compared to high-diversity soils (**Fig. 1C**). The initial level of dilution employed explained 40% and 39% of the variance observed in bacterial and fungal communities, respectively (**Fig. 1D**). Hence, the dilution approach employed in this work resulted in two soils with contrasted levels of phylogenetic diversity and distinct community structure.

#### Initial level of soil diversity impacted the diversity and structure of the plant microbiota

The outcome of community coalescence between seed and soil microbiota was investigated on two plant compartments (stem and root) collected at two distinct plant developmental stages (d07 and d14). On the seedling roots and stems, the most prevalent bacterial and fungal ASVs presented abundance patterns clearly influenced by initial soil diversity (e.g. *Devosia* or *Fusicolla aquaeductuum*, **Fig. S1**). Diverse bacterial (e.g. *Afipia*, *Ensifer*, *Fictibacillus*, *Nocardioides*) and fungal genera (e.g. *Peziza*, *Fusicolla*, *Metarhizium*) were dominant on seedling roots. The stems were dominated by bacterial ASVs affiliated to *Bacillus*, *Nocardioides*, *Devosia* and *Fictibacillus*, while the most prevalent fungal genera were *Fusarium*, *Fusicolla* and *Acremonium* (**Fig. S1**).

Seed genotypes and harvest years did neither impact estimated richness nor phylogenetic diversity in stem and root (**Fig. 2**).

In contrast, the initial level of soil diversity significantly ( $p < 0.05$ ) influenced microbial richness (**Fig. 2A and 2C**) and phylogenetic diversity (**Fig. 2B and 2D**) in stems at d07 and d14, with a higher richness and diversity in stems collected from high-diversity soils. No significant change in bacterial richness and phylogenetic diversity was detected in roots between the two soils (**Fig. 2A and 2B**) while fungal richness and phylogenetic



**Figure 3: Origin of microbial taxa within stem and root communities.** Bacterial (A) and fungal (B) ASVs shared between seeds, soil, roots and stems at each harvesting stage (d07 or d14) and soil diversity (High or Low). For each plot, upper-right bar charts summarize the proportion and relative abundance of plant-associated ASVs that were detected in soil and/or seeds or not detected (unknown) within these habitats.

diversity were almost two times higher in roots from soil of high diversity at each development stage (**Fig. 2C** and **2D**).

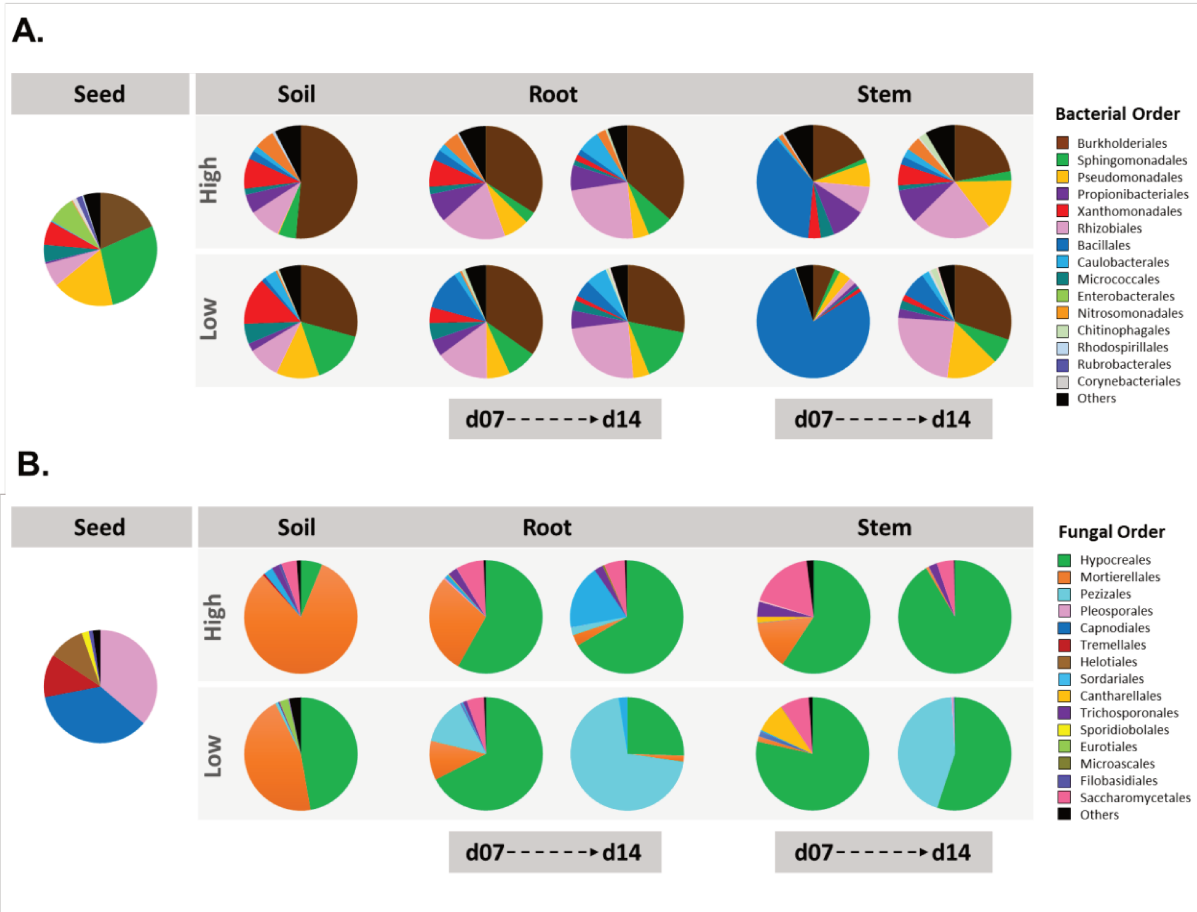
Moreover, there was a little but significant increase in bacterial richness and phylogenetic diversity in stems at stage d14 compared to stage d07. No differences were observed on fungal diversity across stages (**Fig. 2**).

Composition of the plant microbiota was not influenced by the seed genotype and the harvesting year (**Fig. 2E-H** and **Table 2**). In contrast, the initial soil diversity significantly ( $p < 0.001$ ) contributed to the variance observed in stem (14.6%) and root (36.8%) bacterial communities (**Fig. 2I-J**) as well as the variance in stem (24.1%) and root (22.1%) fungal communities (**Fig. 2K-L** and **Table 2**). Stem- and root-associated microbial community compositions were also significantly impacted by the plant developmental stage (**Table 2**).

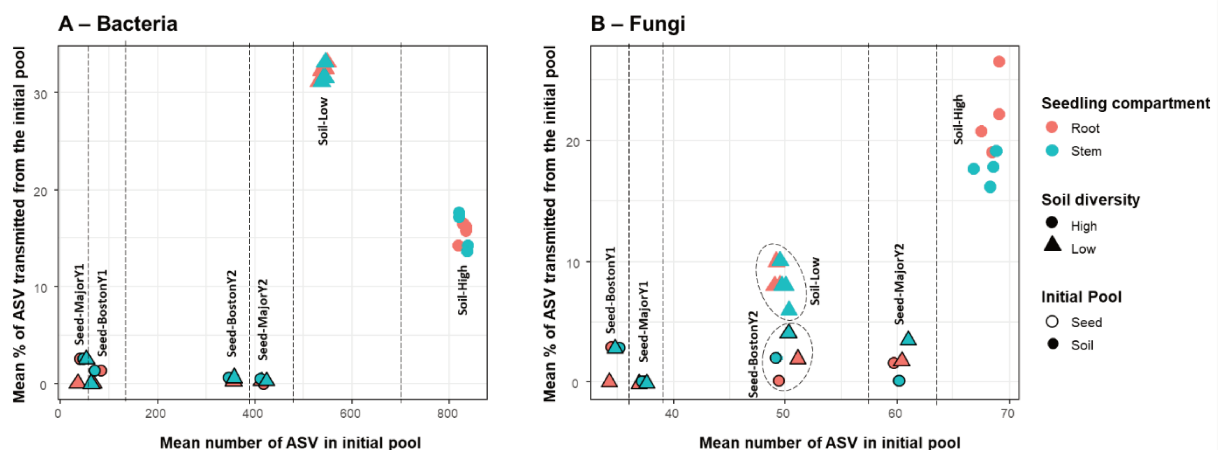
#### *Relative contribution of seed-borne and soil taxa to seedling microbiota*

To describe the outcome of community coalescence between seed and soil microbiota during seedling growth, we characterized the proportion of bacterial and fungal ASVs from seed, soil or unknown origin that composed the stem and root seedling microbiota. A total of 39 bacterial ASVs and 16 fungal ASVs were shared between seeds, roots and stems (**Fig. 3**). Among these ASVs, 16 bacterial and 4 fungal ASVs were also found in soil samples.

Between 35 and 72% of seedling-associated bacterial ASVs were detected in the soil, while 20 to 45% of seedling fungal ASVs came from the soil (**Fig. 3**). These soil-derived ASVs represented between 40 and 98% of the total seedling microbiota. On the contrary, few seedling-associated ASVs were detected in the seed (0.3-15%) representing less than 1% of microbial relative abundance in roots and stems (**Fig. 3**). Lastly, a fraction of the seedling microbiota was of undetermined origin as undetected in the initial seed and soil pools. ASVs of undetermined origin may either correspond to unsampled taxa in soil or seed compartments (*i.e.* rare taxa) or may derive from other environmental sources. The proportion of bacterial ASVs of undetermined origin was higher for plants grown in the high-diversity soil (approximately 45-65% of community membership and composition) than in the low-diversity soil (20-30%) (**Fig. 3** and **Fig. S3A**). This result suggests that seedlings are primarily colonized by rare soil taxa that were initially



**Figure 4: Taxonomic profiles of microbial communities associated to *Brassica napus*.** The 15 most abundant bacterial (A) and fungal (B) orders detected in seeds, soils, roots and stems are displayed.



**Figure 5: Influence of the initial bacterial (A) and fungal (B) diversity of the colonizing pools (seed or soil) on the transmission success to the seedling.** Nature of the initial pool (seed Genotype/Year or soil diversity) is mentioned and separated with dashed lines. Colors represent the receiving seedling compartment.

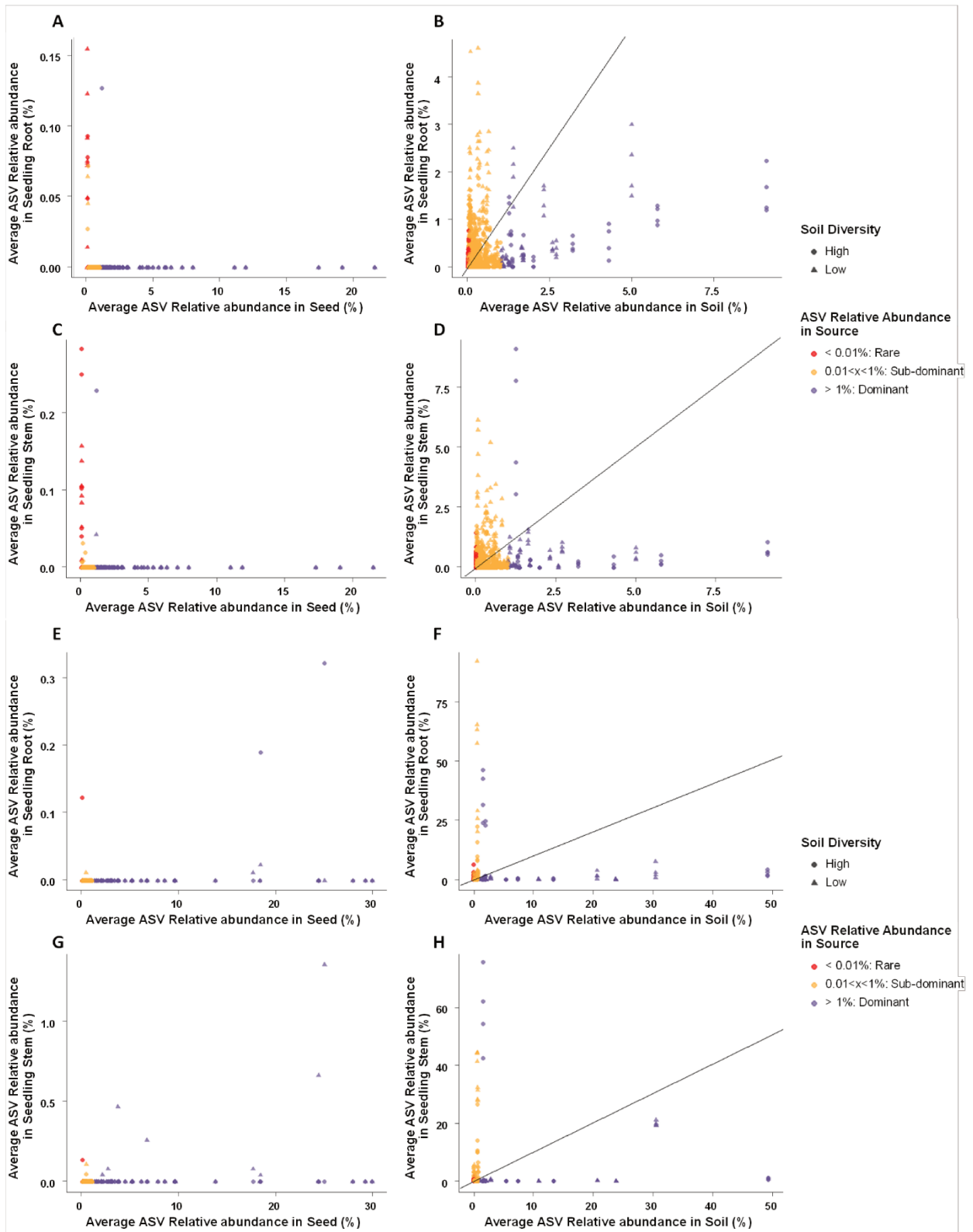
undetected. In contrast, fungal ASVs not detected in soil and seeds represented approximately 40-60% of community membership in plants but their impacts on community (*i.e.* their relative abundance) was quite low with less than 20% regardless of the soil diversity (**Fig. 3** and **Fig. S3B**).

Contrasting microbial taxonomic composition was observed between the initial soil and seed pools. With regards to bacteria, Enterobacterales and Sphingomonadales were more abundant in seeds, while Burkholderiales were more abundant in soils (**Fig. 4A**). Changes in bacterial order relative abundance were also detected between stem and root, especially at d07 where Bacillales dominated the bacterial fraction of the stem microbiota (**Fig. 4A**). The taxonomic composition of the fungal fraction of the seed and soil microbiota was highly contrasted at the order level. Seeds were mainly inhabited by Pleosporales, Capnodiales and Tremellales, when soils were principally constituted of Mortierellales and Hypocreales (**Fig. 4B**). This latter order was however more prevalent in low-diversity soils in comparison to high-diversity soils (**Fig. 4B**).

#### Seedling transmission success of seed-borne and soil microbiota

The contrasted seed lots and soils employed in the experimental design enabled to investigate the influence of the initial diversity of the colonizing pools on the transmission success to the seedling (**Fig. 5**).

For bacteria and fungi, we found no clear relationship between the level of diversity of the initial pool (seed or soil) and the percentage of ASVs transmission in seedlings (**Fig. 5**). Soil microbiota always presented the highest rates of ASVs transmission to seedlings with 10 to 30% of the initial ASV pool. Overall, the transmission of soil-borne microbiota to seedlings was higher for the bacterial community (113-180 ASVs) than for the fungal community (3-18 ASVs, **Fig. 5A, 5B**). For bacteria, transmission to seedlings was higher in low-diversity soil ( $32\% \pm 0.84$ ) compared to high-diversity soil ( $15.6\% \pm 1.49$ , **Fig. 5A**). For fungi, the opposite pattern was observed with a higher percentage of ASVs transmitted to seedlings from high-diversity soils ( $19.8\% \pm 3.24$ ) compared to low-diversity soil ( $8.5\% \pm 1.41$ , **Fig. 5B**). A low percentage of ASVs transmission to seedlings was observed for bacteria ( $0.8\% \pm 0.93$ ) and fungi ( $1.45\% \pm 1.44$ ), with no clear influence of the genotype and harvest year (**Fig. 5**). Finally, ASVs transmission to seedlings was similar on roots and stems, except for the fungal pool of the



**Figure 6: Relationship between relative abundance of transmitted bacterial (A-D) and fungal (E-H) ASVs in the source (seed or soil) and in seedling roots and stems. Each dot represents one ASV and is colored according to its relative abundance in the source (seed or soil).**

high soil diversity where transmission rate in roots was higher ( $22.1\% \pm 3.18$ ) than transmission rate in stems ( $17.7\% \pm 1.2$ , **Fig. 5**).

#### Emergence of rare and sub-dominant taxa in seedlings

We next examined the influence of the initial ASV relative abundance on its seedling transmission success and resulting abundance in roots and stems at d14. ASVs were grouped in three arbitrary abundance classes: rare (average relative abundance  $<0.01\%$ ), sub-dominant (between 0.01 and 1%) and dominant ( $>1\%$ ). An interesting finding was that dominant ASVs in the source pool (seed or soil) almost never became dominant in roots and stems (below 1:1 line) or were not even transmitted to seedlings (**Fig. 6**). The majority of transmitted seed-borne bacterial ASVs were initially rare taxa, with nine out of 11 ASVs in roots and 11 out of 16 ASVs in stems (**Fig. 6A, 6C**). Only one dominant seed ASV (out of 65 in the initial pool) was found to be transmitted to roots and stems (*Afipia*). One sub-dominant ASV was successfully transmitted to both roots and stems (*Blastomonas*) and three sub-dominant ASVs to stems solely (*Pseudomonas lurida*, *Pseudomonas putida*, *Hyphomicrobium*) (**Table S1**). It should be noted that none of these transmitted seed-borne ASVs became dominant in seedlings (relative abundance  $<0.3\%$ ).

The most abundant root bacterial ASVs ( $>1\%$ ) originated from soil-borne ASVs classified as sub-dominant ASVs (n=26 ASVs) and dominant ASVs (5 ASVs) (**Fig. 6B, 6D**). For the stems, most of the abundant ASVs originated from sub-dominant soil ASVs (n=24), a few dominant ASVs (n=6) and one rare ASV. When considering the entire seedling bacterial microbiota and not only the most abundant taxa, we found that 95% of the dominant soil ASVs, 40% of the sub-dominant ASVs and 28% of the rare ASVs were transmitted to roots. For the stems, 86% of dominant ASVs, 40% of sub-dominant ASVs and 29% of rare ASVs were transmitted.

For the fungal community, four seed-borne ASVs were transmitted to both roots and stems, composed of two dominant ASVs (*Alternaria infectoria*, *Cladosporium delicatulum*), one sub-dominant (*Alternaria sp.*) and one rare (*Gibberella avenacea*). In addition to these four ASVs, three additional dominant ASVs, all affiliated to *Alternaria infectoria*, were transmitted to the stems (**Table S2**). For soil-borne fungal ASVs, the most transmitted taxa to roots were sub-dominant ASVs (19 ASVs, 12% of initial pool) with a few dominant taxa (9 ASVs, 53% of initial pool) and seven rare ASVs (12% of initial pool). Similarly, soil-borne ASVs transmitted to stems were predominantly sub-dominant ASVs





(15 ASVs, 10% of initial pool) along with seven dominant ASVs (41% of initial pool) and 6 rare ASVs (11% of initial pool). It should be noted that some of these soil-borne fungal ASVs present extremely high relative abundance in seedlings (>20% relative abundance) compared to seed-borne ASVs (<2% relative abundance).

Altogether, these results indicate that seed-borne taxa transmitted to seedlings are predominantly rare taxa, while transmitted soil-borne taxa are primarily sub-dominant and dominant taxa. Moreover, this analysis shows that the transmission rates of fungi is 2 to 4 times lower than bacteria for all ASV abundance classes (dominant: 41-53% vs 86-95%; sub-dominant: 10-12% vs 40%; rare: 11-12% vs 28-29%).



## DISCUSSION

### *Asymmetric outcome of seed and soil community coalescence in favor of soil microbiota*

Soil microbiota had a great influence on the plant microbiota composition since 70% and 30% of soil-borne bacterial and fungal taxa were detected in seedlings, respectively. In contrast, transmission of seed-borne microorganisms to roots and stems of *B. napus* was lower than soil with on average 2% of bacterial ASVs and 12% of fungal ASVs detected in seedlings. The remaining seedling-associated ASVs were not identified in both seed and soil habitats. It is highly plausible that most of these taxa were soil-borne and were initially not sampled due to the high heterogeneity of soil spatial structure (Rillig *et al.*, 2016). Indeed, there were on average many more bacterial ASVs of undetermined origin in the seedlings cultivated in the soil of high diversity (> 50%) than in those from a soil of low diversity (< 30%). These data suggest that a large part of these ASVs come from the soil but that they were not sampled in high-diversity soils. Overall, these results highlighted an asymmetric outcome of the coalescence between the soil and the seed microbiota (Castledine *et al.*, 2020), where the soil microbiota take precedence over the seed microbiota.

This asymmetric coalescence could be due the high population size of soil-borne taxa in comparison to seed-borne microbial population, a process known as mass-effect (Shmida & Wilson, 1985). Although seed microbial taxa can be considered as plant residents that are adapted to available niches (Morella *et al.*, 2020), the successful invasion of root and stem by soil-borne taxa is undoubtedly facilitated by their population sizes. Alternatively, the dominance of soil associated microbial communities in seedlings could be explained by the higher amount of phylogenetic diversity in soil in comparison to seeds. Higher phylogenetic diversity could indeed increase the functional capabilities of soil associated microbial communities and then limit niche overlap between microbial entities (Martiny *et al.*, 2013). The level of diversity of the initial seed and soil pools were however not directly correlated to the number of seedling transmitted ASVs (**Fig. 5**). In other words, the diversity of the regional species pool (*i.e.* soils and seeds) were not a good predictor of the diversity of local communities (*i.e.* seedlings).

Weak transmission of seed-borne microorganisms to the rhizosphere has been previously reported in Asteraceae (Leff *et al.*, 2017), Cucurbitaceae (Green *et al.*, 2006; Ofek *et al.*, 2011) and Poaceae (Normander & Prosser, 2000; Yang *et al.*, 2017). Survival



on barley roots of seed-borne bacteria occurred in the non-growing part of the root system but not in emerging roots that are colonized principally by soil-borne bacteria (Normander & Prosser, 2000). While we did not investigate the fate of seed-borne microorganisms in different parts of the root system of *B. napus*, the same proportion of seed-borne taxa were detected within stems or roots. Hence, the weak transmission of seed-borne taxa to seedlings was not a consequence of micro-habitat heterogeneity.

*Seedling microbiota assembly is driven by the level of soil diversity but not the structure of the seed microbiota*

The initial level of soil diversity was the key driver in the assembly of the stem and root microbiota. Indeed, stem microbial diversity and root fungal diversity were lower in the low-diversity soils compared to high-diversity soils (**Fig. 2**). Moreover, soil diversity explained between 15% to 37% of variance in microbial community composition in stem and root (**Fig. 2**). The impact of soil diversity on plant microbiota composition increased over time in roots and stems therefore confirming soil resident time and plant age in root microbiota dynamics (Dombrowski *et al.*, 2017; Edwards *et al.*, 2018).

The soil recolonization approach employed in this work did result in two soils with contrasted levels of bacterial and fungal diversity. This modification of soil microbial diversity also impacts the functional diversity and ultimately the soil physicochemical parameters. Changes in  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations and pH between low and high-diversity soils were indeed monitored. A similar drastic switch in the net balance between mineral nitrogen forms, from dominant nitrate forms in the high diversity soil to an altered N-cycle with dominant ammonium forms in the low diversity soil is reported in another soil dilution experiment (Calderón *et al.*, 2017). A lower  $\text{NO}_3^-$  is consistent with a reduced abundance of bacterial and archaeal ammonia oxidizers. A higher  $\text{NO}_3^-$  is linked with a decrease in the abundance of denitrifiers that can reduce  $\text{NO}_3^-$  into  $\text{N}_2$ . Nitrification process is associated with pH reduction prior to  $\text{NO}_2^-$  accumulation period (Venterea & Rolston, 2000), which decreased in this work of 0.75 pH unit. Hence, the impact of soil diversity on seedling microbiota structure could not be solely due to the level of microbial diversity but to local changes of physicochemical parameters.

Contrary to what has been observed in the soil, we did not detect any significant impact of the initial seed microbiota composition on the overall structure of the stem and root microbiota. This observation reflected not only a low transmission of seed-borne



taxa to roots and stems of *B. napus* but also a weak, if not an absence, of historical contingency (Fukami, 2015). Historical contingency is mediated by priority effects that correspond to the impact of species on one another depending on its order of arrival within the local community (Fukami, 2015). Importance of historical contingency in assembly of the plant microbiota was recently highlighted in wheat, where the identity of seed-transmitted fungal taxa can modify colonization of roots by dark septate endophytes, three weeks following germination (Ridout *et al.*, 2019). While we cannot conclude that there is an absence of priority effects between microbial species within the root and stem microbial communities of *B. napus*, historical contingency is not promoted during seedling community assembly.

*Seedling microbiota is primarily composed of initially rare and sub-dominant taxa in source communities*

The initial abundance of microbial taxa in the regional species pool was not positively correlated to their seedling transmission. This was particularly marked for bacterial ASV where rare seed-borne taxa and sub-dominant soil-borne taxa were mostly transmitted to the seedling (**Fig. 6, Fig. S4**). An increase in the abundance of rare taxa in seedlings could be explained by several attributes including more favorable environmental conditions for their growth and awakening from dormancy (Shade *et al.*, 2014). Many seed-borne bacteria enter a viable but non-culturable (VBNC) state (*e.g.* Ghezzi & Steck, 1999; del Campo *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2016). Nutrient-rich environment, such as the spermosphere (Nelson, 2004), can elicit the resuscitation of VBNC cells (Pinto *et al.*, 2015). In any case, the rare-taxa that are selected on seedling must carry specific genetic determinants that are responsible for their higher fitness. These determinants have been probably acquired through horizontal gene transfer, as these rare bacterial taxa were polyphyletic.





## CONCLUSION

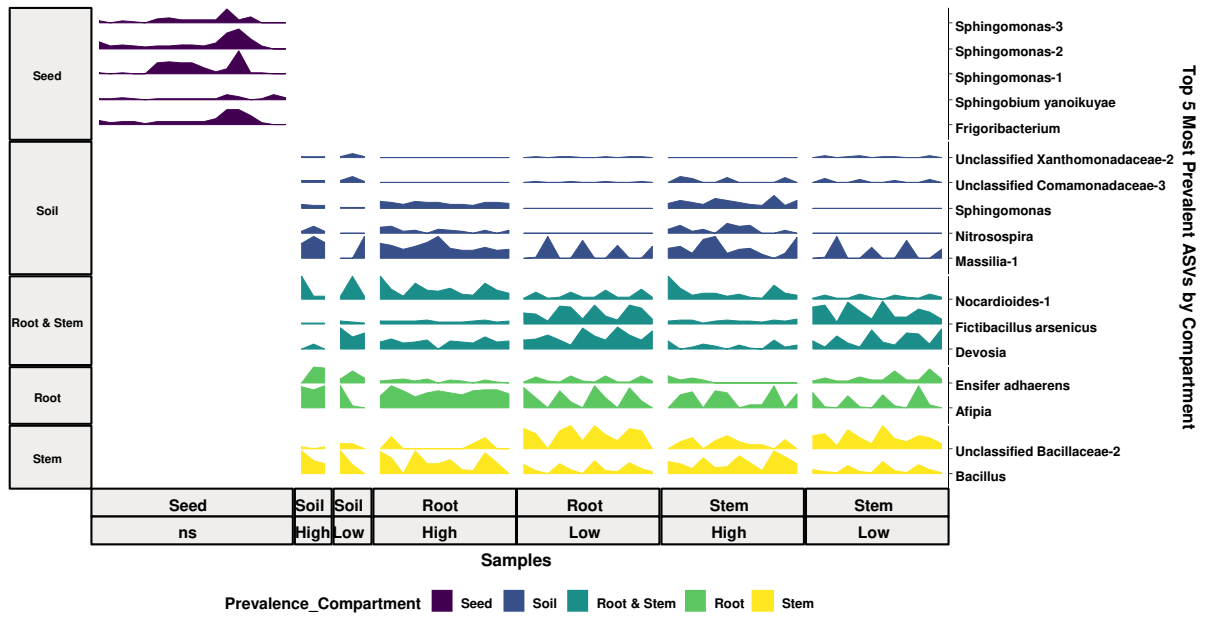
In conclusion, we highlighted that the outcome of seed and soil microbiota coalescence was strongly asymmetrical with a clear dominance of soil microbiota. The level of soil diversity was an important driver of the structure of the seedling microbiota. Our approach enabled us to quantify the relative contribution of seed-borne and soil-borne taxa to seedling microbiota assembly and provided an estimation of transmission rates of each source microbiota. Out of all soil taxa detected, only 8 to 32% were able to colonize seedlings, while the proportion was of 0.8 to 1.4% for seed-borne taxa, which indicates a strong selection during seedling microbiota assembly. We demonstrate a high transmission of rare seed-borne and sub-dominant soil-borne taxa to seedlings, which is also a key feature of this coalescence (**Fig. S4**). These results provide an important foundation for the development of plant microbiome engineering through the modification of native seed or soil microbiota. Particularly, we encourage future work using natural or synthetic communities to integrate rare microbial taxa, as we showed that focusing only on dominant taxa in the source-communities is not informative to understand future seedling microbiota composition.

The community coalescence framework just started to emerge in the field of microbial ecology and we show here that this approach accelerates discoveries related to plant microbiota assembly and microbiome engineering. In this dynamic, further studies are needed to understand the ecological processes involved in this coalescence between seed and soil and how direct inoculation of microorganisms or modification of environmental conditions might alter its outcome.



SUPPLEMENTAL DATA

A - Bacteria



B - Fungi

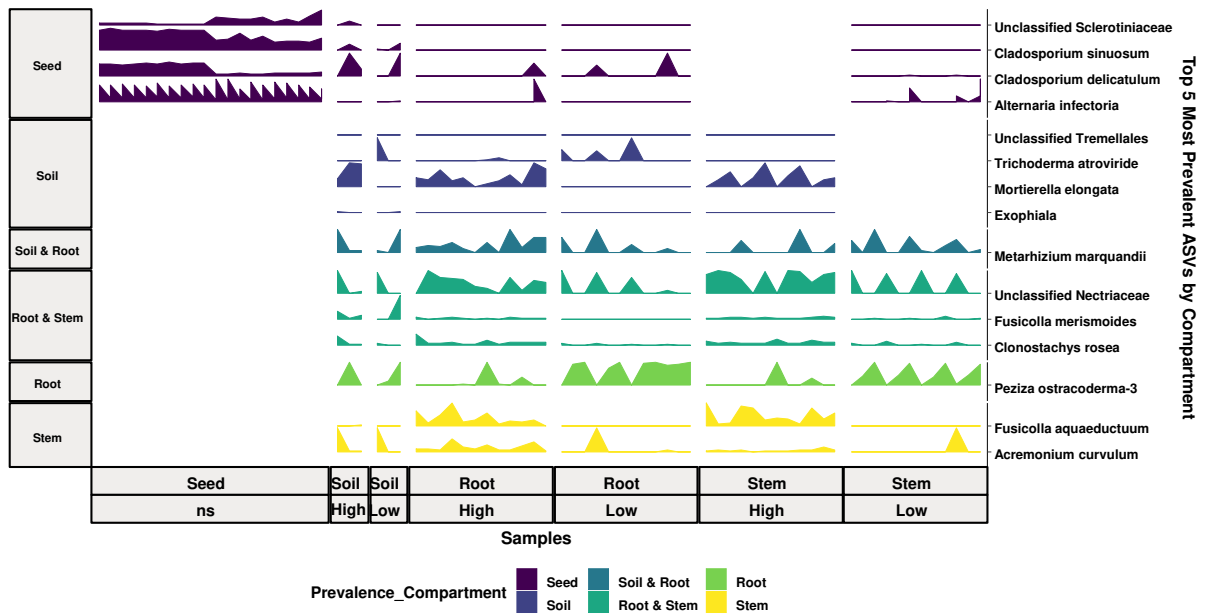


Figure S1: Top five most prevalent bacterial (A) and fungal (B) ASVs in each compartment.



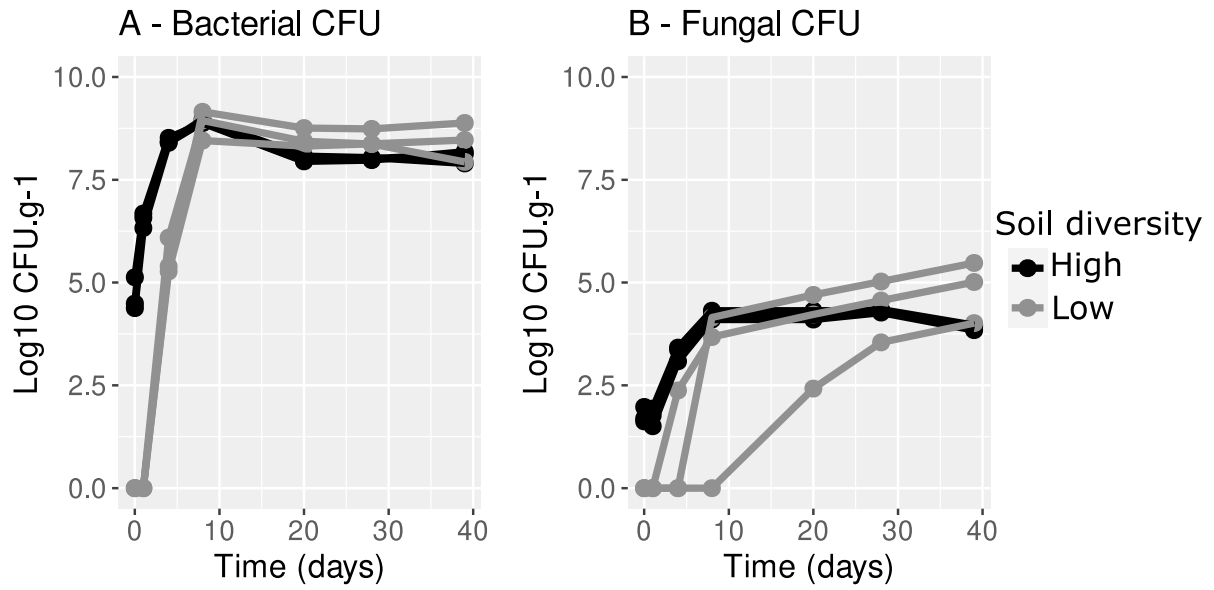


Figure S2: Temporal soil recolonization by bacteria and fungi. Bacterial and fungal populations are expressed as log<sub>10</sub> CFU per gram of soil over time.

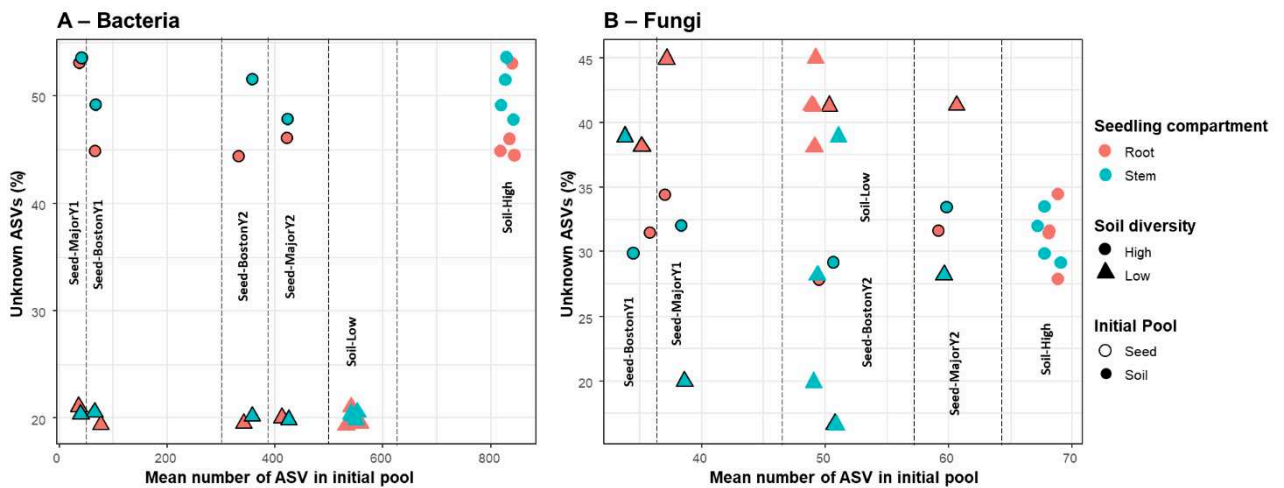


Figure S3: Proportion of bacterial (A) and fungal (B) ASVs of unknown origin in seedlings according to diversity of the initial pool (seed or soil). Nature of the initial pool (seed Genotype/Year or soil diversity) is mentioned and separated with dashed lines. Colors represent the receiving seedling compartment.



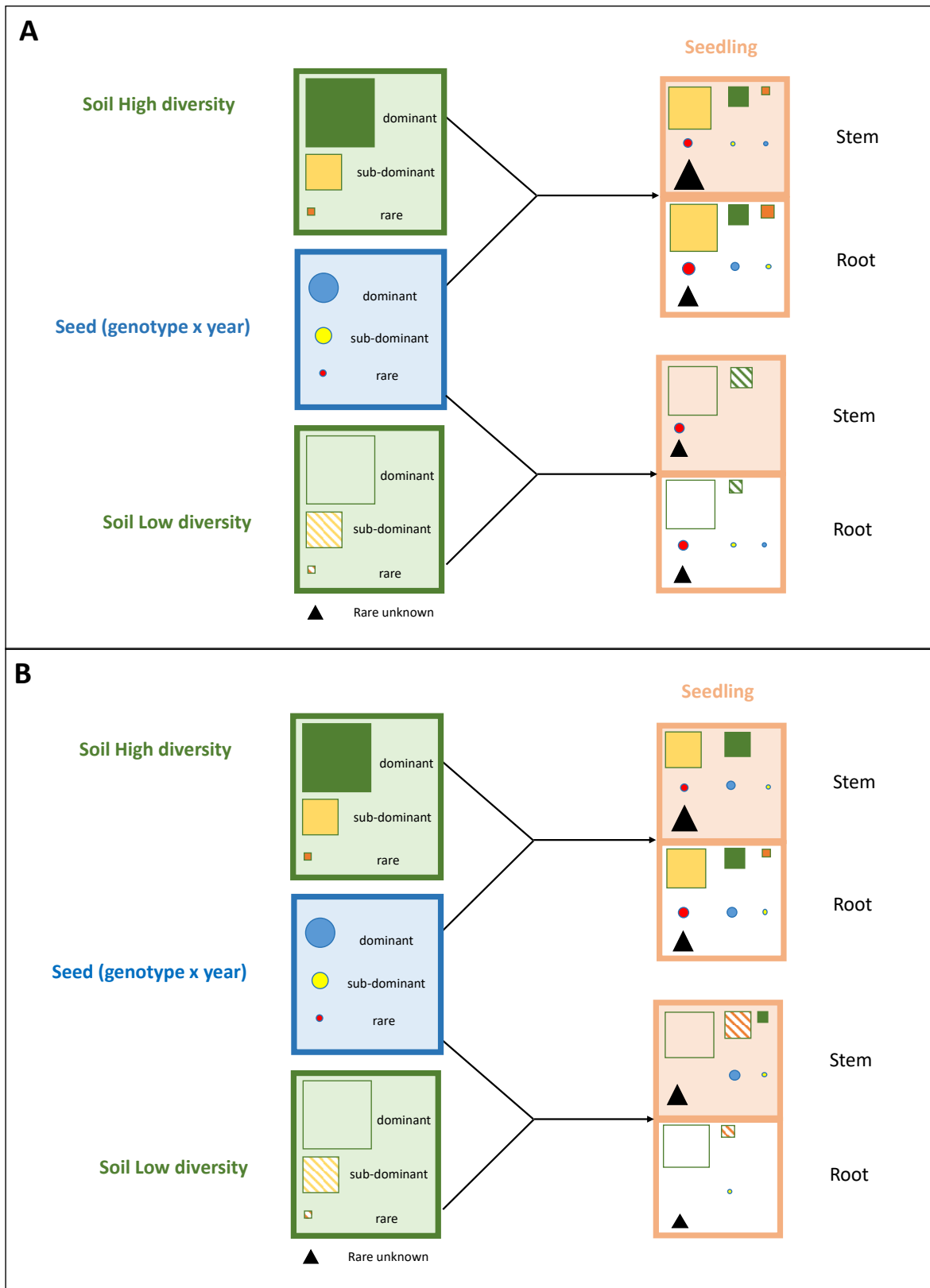


Figure S4: Asymmetric outcome of coalescence of seed and soil microbiota during early seedling growth: relative abundance and transmission of bacterial (A) and fungal (B) taxa.





**Table S1: Bacterial and fungal ASVs transmitted from seed to seedling (root and/or stem).** Relative abundance in seed: rare <0.01%, sub-dominant 0.01%<x<1%, dominant >1%.

<b>Bacteria</b>				
	<b>ASV</b>	<b>Order</b>	<b>Species</b>	<b>Relative abundance in seed</b>
<b>root &amp; stem</b>	ASV314	Micrococcales	<i>Arthrobacter sp.</i>	Rare
	ASV448	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas sp.</i>	Rare
	ASV458	Micrococcales	<i>Terrabacter sp.</i>	Rare
	ASV480	Micrococcales	<i>Arthrobacter sp.</i>	Rare
	ASV546	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Rare
	ASV623	Rhodobacterales	<i>Paracoccus yeei</i>	Rare
	ASV757	Sphingomonadales	<i>Blastomonas sp.</i>	Sub-dominant
	ASV251	Rhizobiales	<i>Afipia sp.</i>	Dominant
<b>root only</b>	ASV1000	Micrococcales	<i>Arthrobacter sp.</i>	Rare
	ASV1119	Propionibacteriales	<i>Nocardioides sp.</i>	Rare
	ASV4636	Rhodobacterales	<i>Paracoccus sp.</i>	Rare
<b>stem only</b>	ASV273	Bacillales	<i>Bacillus megaterium</i>	Rare
	ASV334	Xanthomonadales	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Rare
	ASV419	Burkholderiales	<i>Achromobacter sp.</i>	Rare
	ASV651	Micrococcales	<i>Arthrobacter sp.</i>	Rare
	ASV2583	Micrococcales	<i>Microbacterium sp.</i>	Rare
	ASV479	Propionibacteriales	<i>Cutibacterium acnes</i>	Sub-dominant
	ASV1502	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas lurida</i>	Sub-dominant
	ASV2520	Rhizobiales	<i>Hyphomicrobium sp.</i>	Sub-dominant
<b>Fungi</b>				
	<b>ASV</b>	<b>Order</b>	<b>Species</b>	<b>Relative abundance in seed</b>
<b>root &amp; stem</b>	ASV170	Hypocreales	<i>Gibberella avenacea</i>	Rare
	ASV42	Pleosporales	<i>Alternaria sp.</i>	Sub-dominant
	ASV3	Pleosporales	<i>Alternaria infectoria</i>	Dominant
	ASV7	Capnodiales	<i>Cladosporium delicatulum</i>	Dominant
<b>stem only</b>	ASV11	Pleosporales	<i>Alternaria infectoria</i>	Dominant
	ASV20	Pleosporales	<i>Alternaria infectoria</i>	Dominant
	ASV22	Pleosporales	<i>Alternaria infectoria</i>	Dominant



**Table S2: Bacterial and fungal ASVs transmitted by the soil and becoming dominant (>1%) in seedling.**

Relative abundance in soil: rare &lt;0.01%, sub-dominant 0.01%&lt;x&lt;1%, dominant &gt;1%.

<b>Bacteria</b>				
	<b>ASV</b>	<b>Order</b>	<b>Species</b>	<b>Relative abundance in soil</b>
<b>root &amp; stem</b>	ASV5	Bacillales	<i>Fictibacillus arsenicus</i>	Sub-dominant
	ASV8	Burkholderiales	<i>Massilia sp.</i>	Sub-dominant
	ASV13	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas sp.</i>	Sub-dominant
	ASV20	Rhizobiales	<i>Bosea sp.</i>	Sub-dominant
	ASV22	Rhizobiales	<i>Devosia sp.</i>	Sub-dominant
	ASV30	Propionibacteriales	<i>Nocardioides sp.</i>	Sub-dominant
	ASV38	Caulobacterales	<i>Caulobacter sp.</i>	Sub-dominant
	ASV42	Sphingomonadales	<i>Sphingopyxis sp.</i>	Sub-dominant
	ASV49	Sphingomonadales	<i>Sphingomonas sp.</i>	Sub-dominant
	ASV51	Rhizobiales	<i>Afipia sp.</i>	Sub-dominant
	ASV54	Burkholderiales	unclassified	Sub-dominant
	ASV66	Nitrosomonadales	<i>Methylobacillus sp.</i>	Sub-dominant
	ASV4	Burkholderiales	<i>Massilia sp.</i>	Dominant
	ASV24	Propionibacteriales	<i>Nocardioides sp.</i>	Dominant
ASV35	Sphingomonadales	<i>Sphingomonas pruni</i>	Dominant	
<b>root only</b>	ASV33	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Sub-dominant
	ASV36	Rhizobiales	<i>Afipia sp.</i>	Sub-dominant
	ASV43	Burkholderiales	<i>Massilia sp.</i>	Sub-dominant
	ASV68	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sub-dominant
	ASV71	Burkholderiales	Comamonadaceae	Sub-dominant
	ASV106	Rhizobiales	<i>Bosea sp.</i>	Sub-dominant
	ASV138	Rhizobiales	<i>Pseudolabrys sp.</i>	Sub-dominant
	ASV141	Sphingomonadales	<i>Sphingopyxis sp.</i>	Sub-dominant
	ASV145	Propionibacteriales	<i>Aeromicrobium sp.</i>	Sub-dominant
	ASV155	Bacteroidetes	unclassified	Sub-dominant
	ASV181	Micrococcales	<i>Microbacterium sp.</i>	Sub-dominant
	ASV227	Burkholderiales	<i>Variovorax sp.</i>	Sub-dominant
	ASV274	Caulobacterales	<i>Phenylobacterium sp.</i>	Sub-dominant
	ASV290	Caulobacterales	<i>Caulobacter sp.</i>	Sub-dominant
	ASV23	Burkholderiales	<i>Massilia sp.</i>	Dominant
ASV39	Sphingomonadales	<i>Sphingopyxis sp.</i>	Dominant	
<b>stem only</b>	ASV359	Alphaproteobacteria	unclassified	Rare
	ASV12	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sub-dominant
	ASV14	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas sp.</i>	Sub-dominant
	ASV26	Burkholderiales	<i>Achromobacter sp.</i>	Sub-dominant
	ASV37	Burkholderiales	unclassified	Sub-dominant
	ASV62	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Sub-dominant
	ASV67	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas sp.</i>	Sub-dominant
	ASV87	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Sub-dominant
	ASV104	Burkholderiales	unclassified	Sub-dominant



ASV128	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	Sub-dominant
ASV137	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Sub-dominant
ASV148	Rhizobiales	<i>Devosia sp.</i>	Sub-dominant
ASV229	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Sub-dominant
ASV19	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas sp.</i>	Dominant
ASV34	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dominant
ASV48	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dominant

**Fungi**

	ASV	Order	Species	Relative abundance in soil
<b>root &amp; stem</b>	ASV48	Hypocreales	Nectriaceae	Rare
	ASV55	Hypocreales	<i>Dactylonectria novozelandica</i>	Rare
	ASV63	Hypocreales	<i>Neocosmospora rubicola</i>	Rare
	ASV343	Hypocreales	<i>Bionectria rossmaniae</i>	Rare
	ASV477	Diversisporales	<i>Entrophospora sp.</i>	Rare
	ASV4	Pezizales	<i>Peziza ostracoderma</i>	Sub-dominant
	ASV7	Capnodiales	<i>Cladosporium delicatulum</i>	Sub-dominant
	ASV13	Hypocreales	<i>Fusarium sp.</i>	Sub-dominant
	ASV18	Hypocreales	<i>Clonostachys rosea</i>	Sub-dominant
	ASV29	Hypocreales	<i>Fusicolla merismoides</i>	Sub-dominant
	ASV34	Trichosporonales	<i>Cutaneotrichosporon sp.</i>	Sub-dominant
	ASV40	Hypocreales	<i>Fusicolla aquaeductuum</i>	Sub-dominant
	ASV47	Hypocreales	<i>Acremonium curvulum</i>	Sub-dominant
	ASV49	Trichosporonales	<i>Trichosporon porosum</i>	Sub-dominant
	ASV59	Hypocreales	<i>Fusarium solani</i>	Sub-dominant
	ASV62	Hypocreales	<i>Volutella ciliata</i>	Sub-dominant
	ASV96	Hypocreales	<i>Gibberella intricans</i>	Sub-dominant
	ASV141	Hypocreales	<i>Metarhizium marquandii</i>	Sub-dominant
	ASV170	Hypocreales	<i>Gibberella avenacea</i>	Sub-dominant
	ASV2	Hypocreales	Nectriaceae	Dominant
	ASV5	Hypocreales	<i>Fusarium sp.</i>	Dominant
	ASV6	Mortierellales	<i>Mortierella elongata</i>	Dominant
	ASV8	Mortierellales	<i>Mortierella elongata</i>	Dominant
ASV30	Sordariales	<i>Trichocladium asperum</i>	Dominant	
ASV32	Hypocreales	<i>Metarhizium marquandii</i>	Dominant	
ASV35	Trichosporonales	<i>Apiotrichum gracile</i>	Dominant	
<b>root only</b>	ASV613	Microascales	unclassified	Rare
	ASV23	Hypocreales	<i>Trichoderma atroviride</i>	Sub-dominant
	ASV52	Sordariales	<i>Chaetomium piluliferum</i>	Sub-dominant
	ASV75	Tremellales	unclassified	Sub-dominant
	ASV146	Hypocreales	<i>Clonostachys sp.</i>	Sub-dominant
	ASV153	Hypocreales	<i>Trichoderma velutinum</i>	Sub-dominant
	ASV301	Pezizales	<i>Peziza ostracoderma</i>	Sub-dominant
	ASV17	Mortierellales	<i>Mortierella alpina</i>	Dominant



	ASV26	Mortierellales	<i>Mortierella alpina</i>	Dominant
<b>stem only</b>	ASV11	Pleosporales	<i>Alternaria infectoria</i>	Rare
	ASV268	Hypocreales	<i>Bionectria rossmaniae</i>	Sub-dominant





# CHAPITRE III

---

**INFLUENCE DU MICROBIOTE DES GRAINES ET DE LA DIVERSITE  
MICROBIENNE DU SOL SUR LA REponse DE GENOTYPES DE  
COLZA A *RHIZOCTONIA SOLANI***

---



## CHAPITRE III : INFLUENCE DU MICROBIOTE DES GRAINES ET DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DU SOL SUR LA REPOSE DE GENOTYPES DE COLZA A *RHIZOCTONIA SOLANI*

---

### INTRODUCTION

Dans cette troisième partie, nous avons étudié l'effet du microbiote de la graine sur la réponse de la plante à une maladie d'origine tellurique. Dans le chapitre précédent, aucun effet majeur du microbiote des graines sur la structure et la diversité du microbiote des plantules n'a été révélé, mais quelques taxons bactériens et fongiques provenant de la graine ont été détectés dans les racines et les tiges. Ces quelques variations du microbiote de la plante pourraient avoir un effet sur le développement d'une maladie précoce c'est-à-dire à la germination, à l'émergence ou lors des premiers stades de croissance de la plantule. Ainsi, nous avons choisi le champignon phytopathogène *Rhizoctonia solani* AG2-1 Kühn, un basidiomycète connu pour causer des pourritures racinaires et des fontes de semis chez les plantes de la famille des Brassicacées (Sturrock *et al.*, 2015). Nous avons repris les deux génotypes de colza sélectionnés dans la partie précédente (**chapitre II**) et sensibles au champignon pathogène.

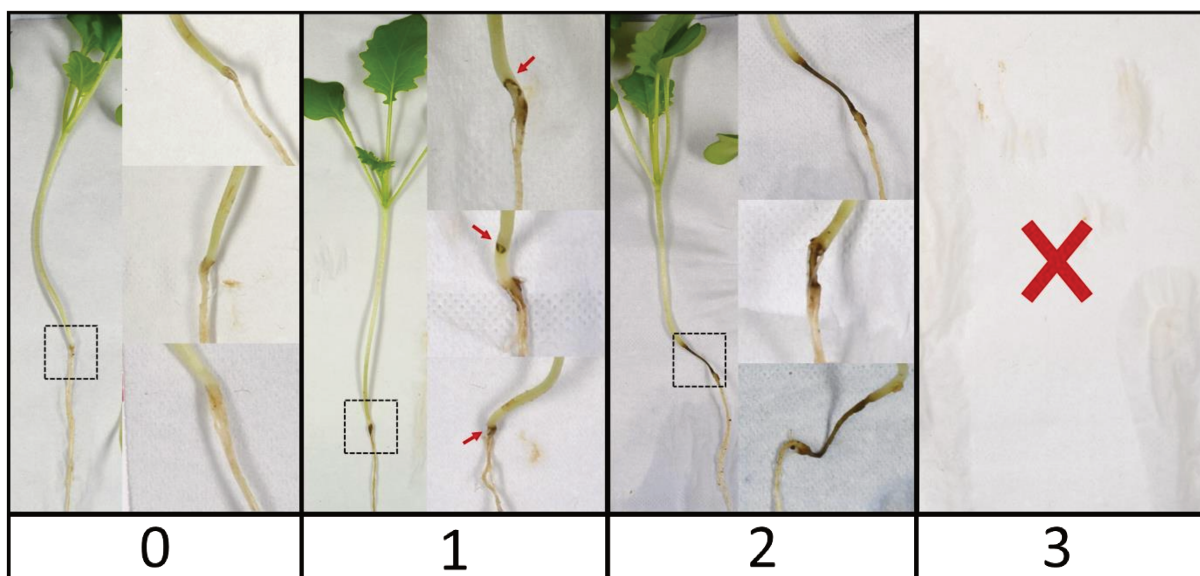
L'expression des maladies d'origine tellurique est très influencée par l'environnement biotique et abiotique du sol (Sanguin *et al.*, 2008, 2009; Postma *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2016). La résistance du sol à une maladie tellurique de la betterave due à *R. solani* est une propriété biologique transférable dans un sol dit réceptif et est étroitement corrélée à la structure et la diversité microbienne du sol (Mendes *et al.*, 2011). Il est généralement proposé qu'une communauté extérieure (pathogène ou non) a une capacité d'invasion ou de persistance plus élevée dans la niche d'accueil si cette niche est caractérisée par une faible diversité microbienne en comparaison avec une niche à niveau de diversité plus élevé (Wei *et al.*, 2015; Mallon *et al.*, 2018). Effectivement, le niveau de diversité microbienne du sol impacte la gravité de la hernie, une maladie tellurique des racines du colza, causée par le protiste pathogène *Plasmodiophora brassicae* (Daval *et al.*, 2020). Mais dans cet exemple, le sol de plus faible diversité entraîne une réduction de la gravité de maladie en regard d'un sol de niveau de diversité plus élevé. Cet effet est donc



contradictoire du principe d'occupation de niche par un pathogène, exposé plus haut. Par ailleurs, l'effet du niveau de diversité du sol sur la gravité de la hernie est inversé suivant le génotype hôte de colza pour les niveaux de diversité élevé et intermédiaire.

Nous posons donc la question de l'effet combiné de la diversité microbienne de la graine et du sol sur la fonte de semis et la pourriture racinaire de plantules de colza provoquées par *R. solani*. Pour cela une comparaison de développement de maladie a été effectuée dans deux sols de diversité microbienne élevée et plus faible. La variabilité du microbiote de la graine et du génotype de *B. napus* est apportée par le choix des deux génotypes sélectionnés dans le chapitre II. D'autre part, nous avons cherché à comprendre l'impact de la présence du champignon pathogène sur la structure du microbiote des plantules.

Afin d'estimer la gravité de la maladie, les observations de symptômes ont été effectuées et différents compartiments de la plante ont été analysés. Les racines, incluant donc les habitats rhizoplan et endosphère, ont été prélevées afin d'une part de quantifier le champignon pathogène et d'autre part d'étudier leur microbiote en présence ou en absence d'inoculum. L'étude du microbiote et la quantification du champignon pathogène ont également été étendues à la tige, organe qui émerge du sol à partir de la graine, et sur lequel des symptômes de nécrose sont aussi observés. En parallèle, la diversité des communautés microbiennes des sols au semis a été décrite.



**Figure 1 : Classes de symptômes provoqués par l'isolat *R. solani* R5 sur colza.** Les classes de symptômes ont été établies sur des plantules 14 jours après semis et inoculation. 0 = pas de symptômes en bas de la tige, 1 = point de nécrose inférieur à 1mm en bas de la tige (indiqués par les flèches rouges), 2 = nécrose étendue sur tige et 3 = plantes non émergées quand le champignon pathogène est inoculé.

## MATERIEL ET METHODE

### Préparation des sols

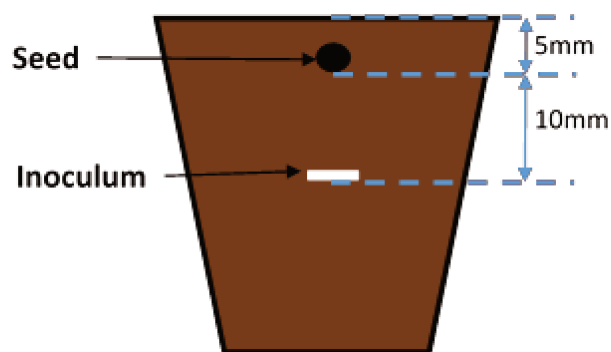
Les sols utilisés dans cette expérimentation sont les mêmes que ceux utilisés dans le **chapitre II** (voir p. 83). Nous avons donc deux sols de diversité microbienne différente : High (diversité élevée) et Low (diversité faible). Après incubation le sol High (pH 6,25) était plus acide que le sol Low (pH 6,89). La recolonisation des sols a été effectuée en 3 répétitions indépendantes (A, B et C) et après les 39 jours d'incubation, un échantillon de chaque sol High et Low a été prélevé et conservé à -80°C jusqu'à extraction d'ADN.

### Préparation de l'inoculum

L'isolat *Rhizoctonia solani* AG2-1 R5 Kühn (téléomorphe *Thanatephorus cucumeris* Donk (A. B. Frank)) (Gilligan & Bailey, 1997) a été mis en culture sur un milieu Malt agar (pH 5,6) 6 jours avant inoculation puis un explant de Ø 5mm a été repiqué sur une membrane en nitrate de cellulose déposée sur Malt agar. Après trois jours d'incubation à 20°C et à l'obscurité, le mycélium a atteint la limite de la membrane. Le jour de l'inoculation, des disques de mycélium calibrés (Ø 3mm) ont été découpés au front de croissance du champignon (mycélium jeune en croissance), à l'aide d'un emporte-pièce stérile.

### Sélection des génotypes

Les deux génotypes de *B. napus* Boston et Major récoltés les années Y1 et Y2 (chapitre II) ont également été utilisés dans cette étude. En plus de présenter des graines aux microbiotes contrastés, des tests préliminaires nous ont permis d'estimer leur sensibilité relative à l'isolat *R. solani* R5. Avant notre étude, il n'existait pas de classes de symptômes adaptées à notre dispositif sur jeunes plantes. Sur la base de ces tests nous avons donc défini 4 classes (de 0 à 3) correspondant aux symptômes de nécrose observés sur le bas de la tige de plantules émergées (classes 0, 1, 2), et à l'absence d'émergence de plantule (classe 3) considéré comme le symptôme de gravité de maladie le plus élevé (**Fig. 1**). Les symptômes sur racines (en général associés aux symptômes sur tiges) peu différents ne pouvaient pas être quantifiés ou classés selon leur sévérité. Nous avons ensuite calculé un indice pathologique (IP) qui reflète la gravité de la maladie. L'IP varie de 0 (absence de symptômes) à 3 (gravité maximale) et est défini par la formule suivante :



**Figure 2 : Dispositif expérimental d'inoculation de *R. solani* R5 et semis de graines de colza.** Un disque de mycélium calibré de 3mm de diamètre a été déposé à 15mm de profondeur dans le sol. Le même jour, le semis a été effectué à 5mm de profondeur c'est-à-dire à 10mm de distance au-dessus de l'inoculum.



$$IP = \frac{(0 * n_0 + 1 * n_1 + 2 * n_2 + 3 * n_3)}{N}$$

Où : 0, 1 et 2 = les niveaux de symptômes des plantes émergées  
 $n_0$  = Nb de plantes de classe 0 = pas de nécrose sur tige  
 $n_1$  = Nb de plantes de classe 1 = nécrose sur tige < 1 mm  
 $n_2$  = Nb de plantes de classe 2 = nécrose sur tige > 1 mm  
 $n_3$  = Nb de plantes non émergées de classe 3  
 $N$  = Nb total de graines semées

Les deux génotypes présentaient tous deux une sensibilité au champignon. Les lots de graines Boston et Major produits en autofécondation pendant deux années consécutives (Y1 et Y2) ont été utilisés, nous avons donc 4 lots de graines aux microbiotes contrastés (Boston Y1 – Boston Y2 – Major Y1 – Major Y2).

### Semis et inoculation

Le dispositif expérimental correspond à celui du chapitre II (coalescence) mais avec l'inoculation du champignon pathogène. Après 39 jours d'incubation des sols, des pots individuels ont été remplis d'abord d'une couche de 5 mm de vermiculite stérile, puis de 80 g de chaque sol High (suspension D0) et Low (suspension D6). Les sols ont été saturés en eau par le bas un jour avant semis, et laissés ressuyer 24h, afin d'atteindre environ 80% d'humidité relative (capacité de rétention) le jour du semis. A d00, juste avant semis, un disque de mycélium (Ø 3mm) sans milieu agar nutritif a été déposé avec une pince de précision à 15 mm de profondeur. Le même jour, 30 graines de chacun des 4 lots ont été semées par modalité (2 années x 2 génotypes) à 5 mm de profondeur, soit 10 mm directement au-dessus de l'inoculum fongique (**Fig. 2**). Ce positionnement de l'inoculum vis-à-vis de la graine réduit le risque d'une attaque trop précoce et trop sévère du champignon qui provoquerait de très fréquentes absences d'émergence ou fontes de semis strictes (donc des observations majoritaires correspondant à la classe 3), et favorise ainsi l'attaque des racines en formation à la germination (pourriture racinaire). Le même nombre de graines a également été semé dans des sols témoin non-inoculés avec le champignon pathogène. Toutes ces conditions ont été établies par un ensemble de tests préliminaires non décrits ici. Les plantes ont été cultivées sous conditions contrôlées (photopériode de 14h jour/10h nuit, 20°C). Le dispositif est maintenu à 80% d'humidité relative par une alimentation en eau par le bas des pots à d07.



L'ensemble de ce dispositif a été répété 3 fois (avec 3 répétitions de préparation de sol High et sol Low et 3 préparations d'inoculum indépendantes), et chaque répétition d'expérimentation (A, B et C) s'est faite à 1 jour d'intervalle.

#### Observation et prélèvements

Sur les 30 graines semées par conditions, 10 étaient réservées pour un prélèvement à d07 et 20 pour un prélèvement à d14. Sept jours (d07) et quatorze jours (d14) après semis et inoculation, l'ensemble des plantes émergées ont été prélevées pour chaque condition inoculée (I), non-inoculée (NI), chaque génotype et année et chaque diversité de sol (2 génotypes x 2 années x 2 sols x 2 conditions x 3 répétitions). A chaque temps, les plantes émergées ont été comptées et dépotées. Les racines ont été brièvement trempées dans de l'eau stérile pour retirer le sol résiduel (rhizosphérique). Les notations de symptômes ont été effectuées à d14 selon les classes préalablement définies (**Fig. 1**). La classe 3 correspond au nombre de plantes non émergées, calculé au *pro rata* du nombre de plantes émergées dans les témoins non-inoculés. Pour chaque temps de prélèvement, les racines ont été séparées des tiges. La longueur des tiges prélevées a été calibrée à 2 cm à partir du collet. Les échantillons de tiges et de racines ont été recueillis dans des tubes Eppendorf de 2 mL et immédiatement conservés à -80°C.

#### Extraction d'ADN, construction des librairies d'amplicons, séquençage et traitement

La totalité des échantillons de sol, racines et tiges a été lyophilisée avant extraction d'ADN. Les échantillons ont été mélangés avec des billes en verre stériles de 1mm et 3mm, et les tissus végétaux ont été broyés au FastPrep (MP Biomedicals) 2 x 30s à 5m/s. L'ADN a été extrait à l'aide du kit DNeasy PowerSoil HTP 96 (Qiagen).

Les librairies d'amplicons ont été construites avec les couples d'amorces gyrB\_aF64/gyrB\_aR553 (Barret *et al.*, 2015) et ITS1F/ITS2 (Buée *et al.*, 2009) en suivant le même protocole que dans les chapitres I et II. Les librairies d'amplicons ont été séquencées sur le même run de séquençage que les échantillons du chapitre précédent, avec une cartouche MiSeq v3 600 cycles.

Les séquences et les fichiers Fastq comprenaient les données des échantillons de ce chapitre et du chapitre précédent. Le traitement des fichiers et les paramètres utilisés dans DADA2, ainsi que les versions des bases de données utilisées sont donc identiques à ceux détaillés dans le chapitre précédent.



### Analyse phénotypique

La sévérité des symptômes a été analysée par le calcul de la fréquence de chaque classe de symptômes observés pour chaque condition étudiée (2 géotypes x 2 années x 2 sols x 3 répétitions). Des modèles mixtes à lien cumulatif (clmm) ont été effectués pour mesurer la significativité des résultats, avec la variable « Répétition » placée en facteur aléatoire. Une analyse de variance de type II a été effectuée sur ces modèles et les différences étaient considérées comme significatives à une p-value < 0,05.

### Séquençage de la portion ITS1-ITS4 de la souche R5

Pour rappel, les cellules de *R. solani* sont polynucléées, et plusieurs allèles polymorphes peuvent être présents au sein d'une cellule. Pour connaître le nombre d'allèles de la région intergénique ITS1 chez l'isolat *R. solani* R5, l'ADN a été extrait à partir de mycélium cultivé sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA). Les amorces ITS1-ITS4 ciblant les régions intergéniques ITS1, ITS2 et le gène de l'ARNr 5.8S ont été utilisées pour l'amplification par PCR (White *et al.*, 1990). L'ADN a été envoyé à Genoscreen (Lille, France) pour séquençage Sanger (ABI3730xl).

### Quantification du champignon pathogène

Le champignon pathogène *R. solani* R5 a été quantifié par PCR quantitative dans tous les échantillons de tiges et de racines inoculées. Les amorces AG2-1F/AG2-1R spécifiques des souches du groupe d'anastomose AG2-1 ont été utilisées pour la quantification (Budge *et al.*, 2009a). Pour la gamme étalon, de l'ADN de *R. solani* R5 a été extrait à partir de mycélium lyophilisé, quantifié au Nanodrop (ThermoFisher Scientific), et dilué jusqu'à  $10^{-7}$ . La quantification a été effectuée au LightCycler 480 sur tous les échantillons d'ADN (2  $\mu$ L par puits) en triplicat, avec 5  $\mu$ L de Sybr Green I Master Mix (ThermoFisher Scientific) et 0,5  $\mu$ L des amorces F et R (10  $\mu$ M). L'amplification a débuté par une dénaturation 95°C, 10 min, suivie de 45 cycles de dénaturation (95°C, 10 sec), polymérisation (64°C, 40 sec). Un dernier cycle de dénaturation/polymérisation a permis de tracer les courbes de fusion.

En parallèle, les ASV fongiques correspondant aux séquences ITS1 de l'agent pathogène ont été identifiés et l'abondance relative du champignon pathogène a été calculée dans les échantillons inoculés. Les échantillons non-inoculés contenant plus de



10% de séquences de pathogène (n=2) ont été supprimés de l'analyse. De même, une vérification de l'absence du pathogène a été menée dans les échantillons de sol.

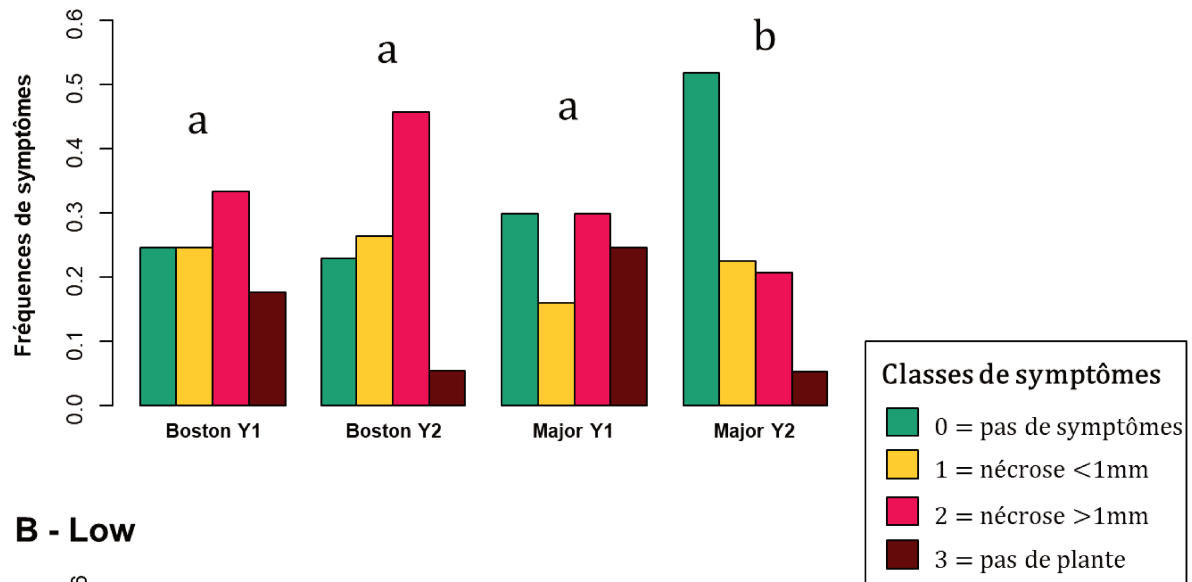
#### Analyse des communautés microbiennes

L'ensemble des analyses de diversité a été réalisé avec le package Phyloseq v1.26.0 (McMurdie & Holmes, 2013). Tous les ASV dont le nombre de comptage par échantillons était inférieur à 10 ont été retirés du jeu de données. Après visualisation de la profondeur de séquençage et des courbes de raréfaction, la taille des échantillons de racines et de tiges a été normalisée à 1000 séquences pour les bactéries et les champignons. A ce seuil, le plateau de richesse n'était pas atteint pour tous les échantillons. La richesse bactérienne et fongique (nombre d'ASV par échantillon) a donc été estimée avec l'indice Chao1. L'indice inverse de Simpson a été utilisé pour calculer la diversité bactérienne et fongique. Une analyse de variance a été effectuée à partir de modèles linéaires et les différences étaient considérées comme significatives à une p-value < 0,05. La  $\beta$ -diversité a été visualisée par une analyse en coordonnées principales (PCoA) sur l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis pour les champignons et une matrice UniFrac pondérée (wUF) pour les bactéries (Lozupone & Knight, 2005). Pour quantifier la contribution relative de chaque variable étudiée sur l'assemblage des communautés microbiennes, une analyse de variance permutacionnelle multivariée (PERMANOVA; Anderson, 2001) a été effectuée avec la fonction adonis2 du package R vegan 2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2017).

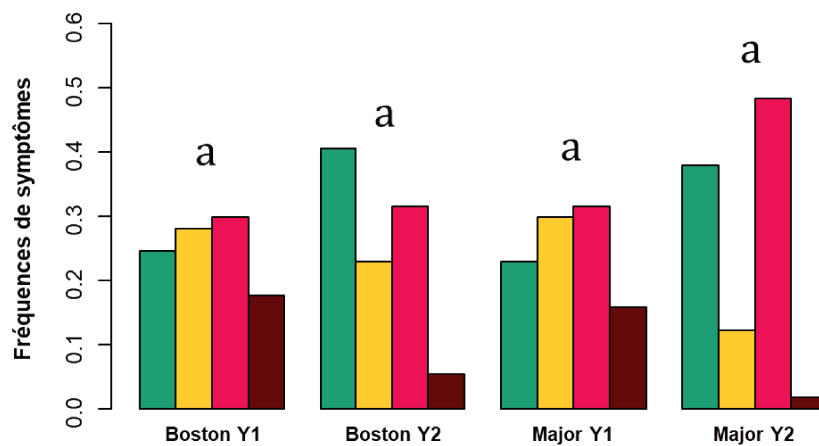
Afin d'identifier les ASV bactériens dont l'abondance relative était positivement ou négativement impactée par la présence du pathogène, une analyse a été menée sur les échantillons de tiges et de racines prélevés à d14 avec le package R TITAN2 2.4 (Baker & King, 2010). Cette analyse consiste à évaluer l'incidence du champignon pathogène sur l'abondance relative des taxons selon un gradient de concentration de *R. solani* R5. Les données de qPCR ont été utilisées pour établir ce gradient de concentration. Tous les ASVs présents dans moins de 3 échantillons n'ont pas été pris en compte dans cette analyse.

L'organisation taxonomique des ASV bactériens répondant significativement à l'analyse TITAN a été visualisée sur un arbre phylogénétique construit à partir d'une analyse Neighbor-Joining avec les packages DECIPHER 2.12.0 et Phangorn 2.5.5. L'arbre phylogénétique a été visualisé avec iTOL (Letunic & Bork, 2019).

### A - High



### B - Low



**Figure 3 : Distribution de la fréquence des symptômes provoqués par inoculation de l'isolat *R. solani* R5 selon le lot de graines de *B. napus* initial (génotype/année) et la diversité de sol (A: High, B: Low). Les classes de symptômes ont été notées sur le bas de la tige à d14 et établies selon l'étendue de la nécrose. Pour chaque sol, les niveaux de significativité ( $p < 0,05$ , modèle mixte à lien cumulatif (clmm)) entre les lots de graines sont indiqués par des lettres.**



## RESULTATS ET DISCUSSION

### Rappel sur la diversité du microbiote des pools de départ

Les sols High et Low utilisés dans cette étude étaient issus de la même recolonisation de sol que ceux utilisés dans le chapitre précédent. De même, les génotypes utilisés étaient les mêmes (Major et Boston, Y1 et Y2). Pour rappel, la diversité microbienne dans le sol Low était effectivement plus faible que celle du sol High et la structure des communautés microbiennes dans ces deux sols était contrastée. La richesse, la diversité phylogénétique et la structure des assemblages bactériens et fongiques étaient significativement contrastées entre les lots de graines, notamment entre années de récolte mais également entre génotypes surtout pour Y1 (voir p. 87, **Chapitre II – Fig. 1**). Après vérification, aucun ASV correspondant au champignon pathogène *R. solani* n'a été détecté dans les échantillons de graines et de sol.

### Analyse phénotypique et quantification du pathogène à d14

L'analyse phénotypique a été réalisée 14 jours après semis et inoculation. Les symptômes de nécrose étaient visibles et quantifiables sur le bas de la tige. La notation des symptômes a été effectuée sur chaque plante émergée inoculée et la fréquence de chaque classe de 0 à 3 été calculée. Après analyse du pourcentage d'émergence dans les témoins, aucune différence significative n'a été révélée entre génotypes, années et diversité de sol, la moyenne étant de 95% d'émergence (**Fig. S1**). Cependant, l'émergence des plantes inoculées (70 à 90%) est significativement plus faible que celle des témoins (90 à 100%). (**Fig. S1**). Il y a donc un effet de l'inoculation du champignon pathogène sur le nombre de plantes émergées, correspondant à la classe 3 dans l'échelle de notation.

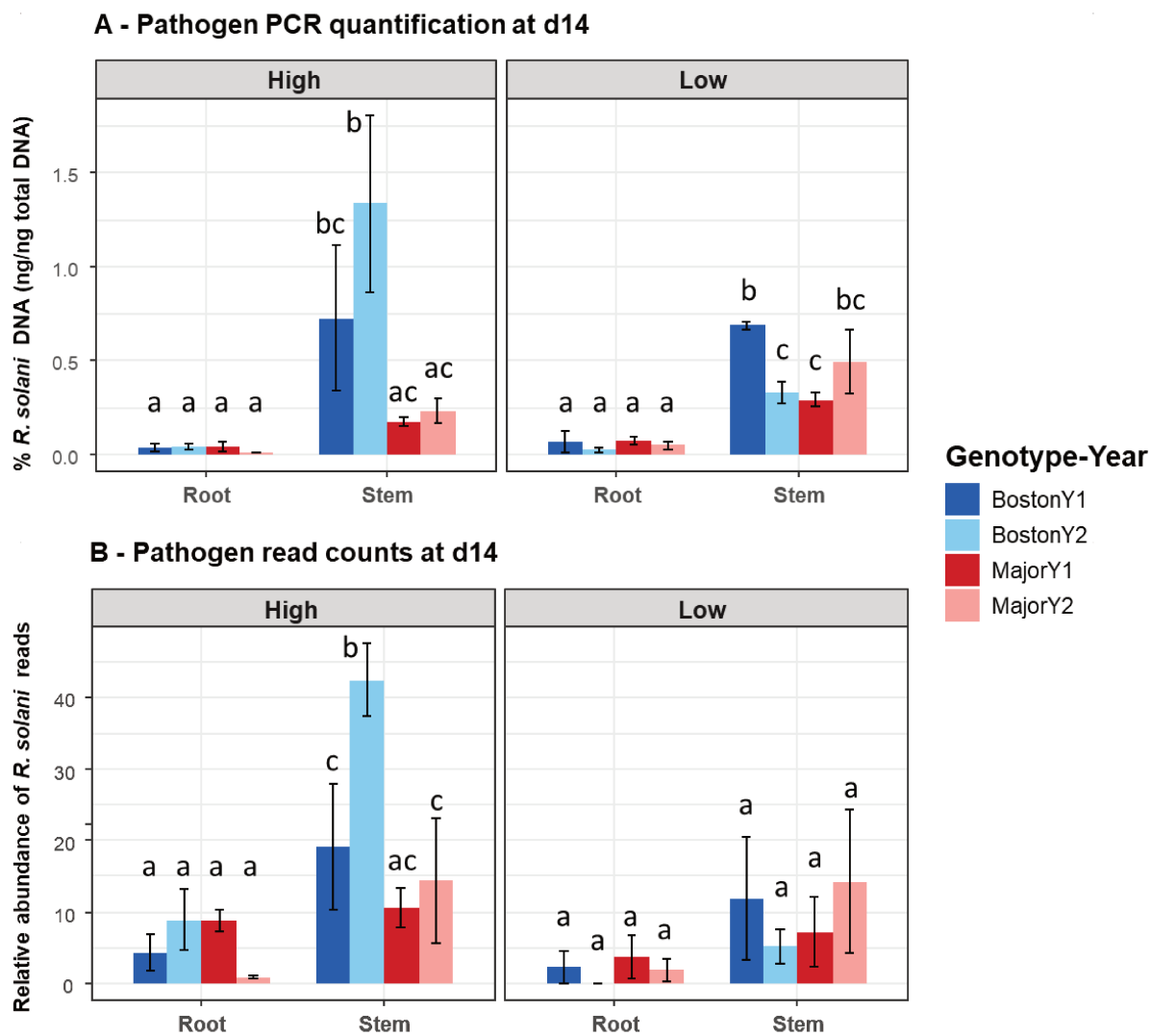
Aucune différence significative d'expression de maladie due à l'effet du facteur « diversité de sol » n'a été observée ( $P > 0.05$ ). Il est probable que dans notre dispositif où la graine est placée très proche de l'inoculum et germe en un jour, la phase d'extension du mycélium dans le sol est très courte et rapide, donc peu altérée par le niveau de diversité microbienne du sol. Cependant, dans le sol de forte diversité (High), le profil des fréquences de symptômes était significativement différent chez Major Y2 en comparaison avec les autres génotypes/années ( $P < 0.05$ ) (**Fig. 3A**). Major Y2 présentait des symptômes moins sévères que les autres avec 50% de plantes ne présentant pas de symptômes (classe 0). A l'inverse, le même génotype récolté l'année précédente (Major



Y1) présentait plus de 70% de plantes symptomatiques avec presque 60% de symptômes sévères (classe 2 et 3). Le génotype Boston Y2 présentait seulement 20% de plantes asymptomatiques et plus de 40% de plantes avec nécrose étendue (classe 2). Cependant, seul Major Y2 était significativement différent de tous les autres (**Fig. 3A**). Pour les deux génotypes, la fréquence de plante non émergées est plus faible en Y2 qu'en Y1 (**Fig. S1**). Ce résultat pourrait en partie s'expliquer par une cinétique de germination plus rapide pour les graines Boston Y2 et Major Y2 que pour les graines Y1 (Rocheffort *et al.*, 2019) ce qui permettrait une élongation racinaire plus rapide et ainsi une attaque moins sévère de *R. solani*, donc un taux d'émergence plus élevé. Par ailleurs, la capacité finale de germination *in vitro* est la même pour les deux années Y1 et Y2 (100%) (Rocheffort *et al.*, 2019) et le pourcentage d'émergence des non-inoculés n'est pas significativement différente dans les 2 sols entre Y1 et Y2 pour les 2 génotype (**Fig. S1**).

Dans le sol de faible diversité (Low), aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) n'a été observée entre les génotypes et années, sur la distribution des fréquences de symptômes (**Fig. 3B**). Le sol High favorise donc les différences de niveaux de symptôme entre les lots de plantes, et Major Y2 est moins sensible à la maladie dans ce sol. L'indice pathologique calculé à partir de ces données est présenté en figure S2 et montre bien que Major Y2 a une valeur d'IP moins élevée que les autres génotypes-années dans le sol High (**Fig. S2**).

Les résultats de séquençage Sanger de la portion ITS1-ITS4 du génome de la souche *R. solani* R5 ont indiqué un polymorphisme nucléotidique à deux positions différentes de la région ITS1. La première position peut prendre la forme T ou C (pyrimidines) et la seconde position peut prendre la forme A ou G (purines). Dans ce jeu de données, quatre ASV ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Rhizoctonia solani*: ASV9, ASV12, ASV14 et ASV503. Un alignement multiple des séquences des 4 ASV obtenues en métabarcoding et de la portion ITS1-ITS4 obtenue par séquençage Sanger a été effectué avec l'outil d'alignement multiple Clustal  $\Omega$  (**Fig. S3**). L'ASV503 était très rare et seulement identifié dans un échantillon. Dans tous les échantillons de tiges et de racines inoculées, la présence des trois autres ASV était toujours simultanée. L'ASV9 était le plus abondant en terme de nombre de comptages (environ 50% des séquences contre 25% pour l'ASV12 et l'ASV14), suggérant que cette version de la région intergénique ITS1 est majoritaire chez la souche *R. solani* R5. Les proportions relatives des ASV9, ASV12 et

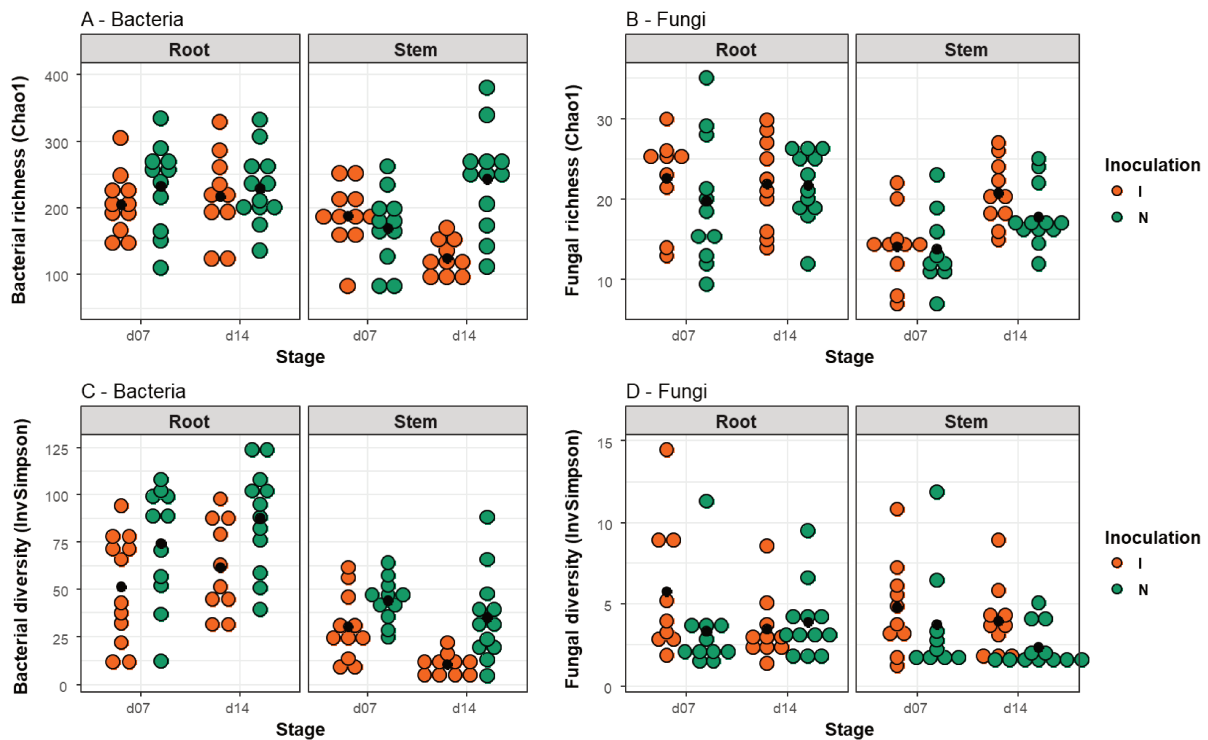


**Figure 4 : Relation entre la quantification de *R. solani* R5 par qPCR et l'abondance relative de l'ASV correspondant, dans les racines et les tiges de chaque génotype et année, selon la diversité de sol.** A: quantité d'ADN de *R. solani* dans les échantillons de racines et de tiges, exprimée en % de ng/ng d'ADN total. B: Abondance relative de l'ASV fongique correspondant au pathogène dans les échantillons de racines et de tiges. Les résultats sont présentés pour les 4 lots (génotype/années) et chaque diversité de sol (High et Low). Pour chaque panel, les niveaux de significativité sont indiqués par des lettres ( $p < 0,05$ ).

ASV14 étaient les mêmes dans tous les échantillons de plantes inoculés. Afin de ne pas surestimer l'abondance relative du pathogène, celle-ci a donc été calculée sur la base du nombre de séquences de l'ASV9.

L'abondance relative (ASV9) et la quantité d'ADN (qPCR) de *R. solani* R5 ont été comparées dans les compartiments racines et tiges (**Fig. 4**). Pour le sol High (panel de gauche), l'abondance relative du pathogène était significativement plus élevée dans les tiges de Boston Y2 que dans celles des autres génotypes/années (**Fig. 4B**) tandis qu'avec des quantités plus variables par qPCR, Boston Y2 et Boston Y1 n'étaient pas significativement différents, mais la quantité était supérieure dans Boston Y2 en comparaison avec Major Y1 et Y2. (**Fig. 4A**). Pour le sol Low (panel de droite), l'abondance relative n'était pas différente entre les racines et les tiges ni entre les génotypes/années, tandis qu'en qPCR, les quantités sont différentes entre racines et tiges. Ainsi, bien que les profils globaux entre ces deux méthodes aient la même tendance, les niveaux de significativité étaient différents. L'abondance relative du champignon pathogène renseigne sur un indicateur différent de la quantité réelle obtenue par qPCR.

Par qPCR, la quantité de *R. solani*R5 était très faible (moins de 0.1% de l'ADN total) dans les racines de tous les lots, quelle que soit la diversité de sol (**Fig. 4A**). Dans les tiges de Boston Y1 et Boston Y2, la quantité de champignon pathogène était significativement plus élevée ( $P < 0.05$ ) que dans les racines. La quantité de pathogène dans les tiges de Boston Y2 s'élevait en moyenne à 1.3% tandis que dans les tiges de Major Y2 elle était significativement inférieure (0.25%) pour le sol High ( $P < 0.05$ ). Dans le sol Low, une différence de quantité de pathogène entre racines et tiges est observée et dans les tiges quelques différences sont observées (**Fig. 4A** – panel de droite). Cependant, ces résultats ne se recoupent pas avec ceux des fréquences de symptômes calculées pour le sol Low, dans lequel aucune différence entre génotypes et années n'était observée (**Fig. 3B**). Par contre pour le sol High, la quantité de champignon pathogène dans les tiges semble mieux corrélée aux phénotypes observés. En effet, les différences de quantité de champignon pathogène entre Major Y2 et Boston Y2 sont à l'image des fréquences de symptômes calculées pour ces génotypes dans le sol High, où Major Y2 était significativement moins sensible à la maladie que Boston Y2 (**Fig. 3A, Fig. 4A**). Ainsi, il semble que sur la récolte Y2, il y ait un effet du génotype de l'hôte sur la réponse à la maladie provoquée par *R. solani* et que ces différences de phénotype sont favorisées dans un sol de forte diversité.



**Figure 5 : Effet de l'inoculation sur la richesse et la diversité microbienne des plantules du sol High.** A : Richesse bactérienne. B : Richesse fongique. C : Diversité bactérienne. D : Diversité fongique. La richesse a été estimée avec Chao1. La diversité a été mesurée avec l'indice inverse de Simpson. Chaque panel a été organisé en fonction du stade de développement dans les racines et les tiges. Les couleurs représentent la présence (I) ou non (N) du champignon pathogène. Le point noir représente la moyenne.

**Tableau 1 : Analyse de variance effectuée sur l' $\alpha$ -diversité microbienne des plantules du sol High.** Pour chaque estimateur de diversité (Chao1 et InvSimpson), un modèle linéaire intégrant le compartiment de plante (racine, tige), le stade de développement (d07, d14), l'inoculation (I, N) et le génotype/année (BostonY1, BostonY2, MajorY1, MajorY2) a été construit. Les valeurs significatives sont indiquées par une étoile ( $P < 0.05$ ).

	Bacteria		Fungi	
	Richness	Diversity	Richness	Diversity
<b>Compartment</b>	0.015 *	<0.001 *	0.0001*	0.505
<b>Stage</b>	0.506	0.839	0.0086 *	0.145
<b>Inoculation</b>	0.006 *	<0.001 *	0.209	0.048 *
<b>Genotype/Year</b>	0.83	0.448	0.34	0.338

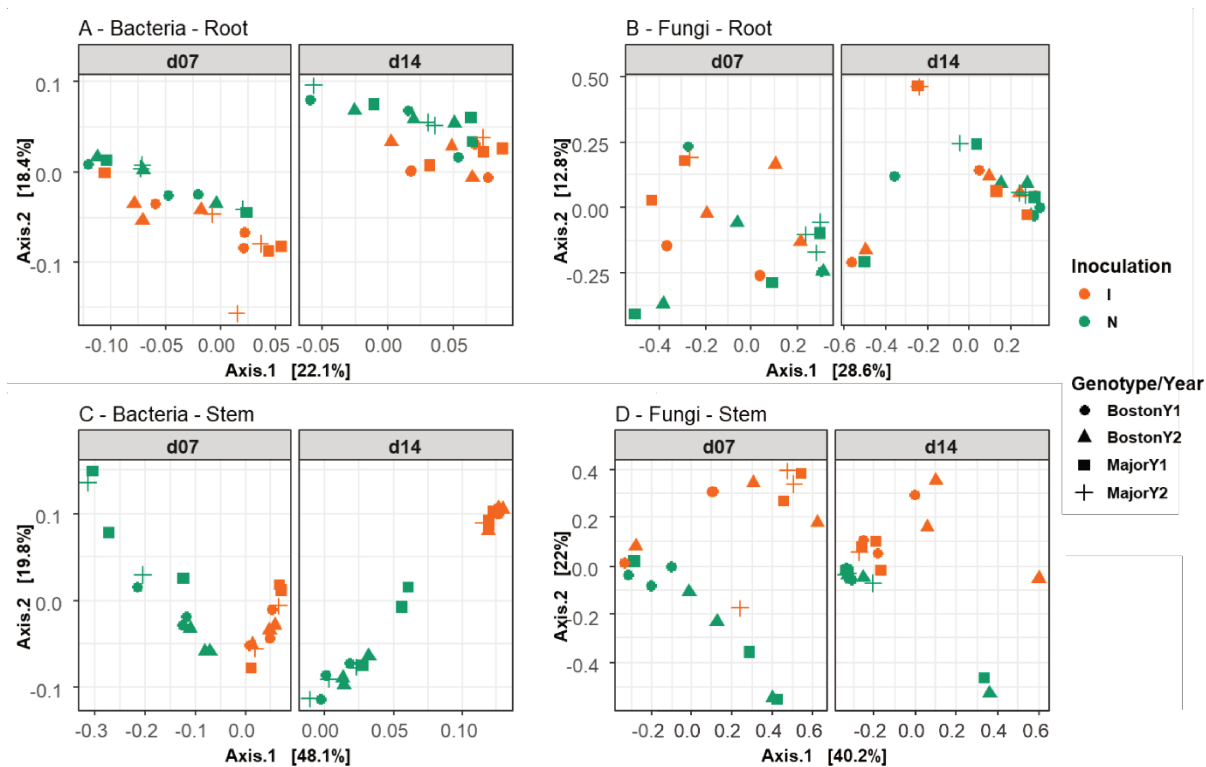
Dans tous les cas, les résultats de symptômes de maladie ne sont pas superposables aux résultats de quantification du champignon pathogène. En effet, la quantification n'est réalisée que sur le pool des plantules émergées alors que la notation de maladie intègre une classe de gravité maximale (classe 3) avec l'absence d'émergence (donc inaccessible à la quantification qPCR). Lors des infections de racines par le mycélium de champignons nécotrophes, il peut exister une faible correspondance entre la quantité d'ADN de mycélium et la quantité de symptômes, surtout si le parasite est en partie ectotrophique (Daval *et al.*, 2011). En effet, *R. solani* provoque des symptômes seulement s'il pénètre dans le système vasculaire de la plante mais une partie de son mycélium se développe également à la surface des racines (Yang *et al.*, 1992; Keijer *et al.*, 1997) ce qui signifie que la quantité de mycélium n'est pas toujours un bon indicateur de la quantité de symptômes.

Pour résumer, seul le sol High supporte des différences d'expression de maladie avec Major Y2 (IP moyen 0,75) moins affecté par *R. solani* R5 que les autres génotypes-années (IP moyen 1,35). Donc la différence de sévérité de maladie entre Major-Y1 et Major-Y2 est attribuable à la différence de composition de microbiote initial des graines alors qu'on n'observe pas un tel effet pour Boston. Toujours avec le sol High, des différences de quantité de mycélium du champignon pathogène sont observées dans les tiges avec 2 à 3 fois plus d'ADN fongique pour Boston Y2 que pour les autres génotypes-années.

#### Effet de la maladie sur la diversité et la composition des assemblages microbiens

Afin de voir si les différences de sensibilité au pathogène de Major Y2 avec les autres combinaison génotypes-années dans le sol High sont corrélées à des différences de diversité et de composition de leur microbiote, une analyse de la diversité  $\alpha$  et  $\beta$  a été menée sur le microbiote de chaque lot (2 génotypes x 2 années) en fonction de l'inoculation. Comme le sol Low n'a favorisé aucune différence significative d'expression de maladie (symptômes) entre les lots, seul le sol High a été retenu pour ces analyses.

Aucun effet du génotype ou de l'année n'a été relevé sur la richesse estimée et sur la diversité bactérienne et fongique, et ce en présence ou non du pathogène ( $P > 0.05$ , **Tableau 1**). Comme il n'y avait pas de différences et pour simplifier la représentation graphique des résultats de l' $\alpha$ -diversité, aucune distinction n'a été faite entre les lots de graines initiaux (**Fig. 5**).



**Figure 6 : Effet de l'inoculation sur la structure des communautés bactériennes (A, C) et fongiques (B, D) dans les racines et les tiges du sol High.** Une analyse en coordonnées principales (PCoA) des distances UniFrac pondérées et des indices de Bray-Curtis a été calculée pour les bactéries et les champignons, respectivement. Les symboles représentent le génotype/année et les couleurs représentent la présence ou non du champignon pathogène.

**Tableau 2 : Analyse de variance multivariée permutacionnelle sur les indices de  $\beta$ -diversité microbienne des plantules du sol High.** Les modèles linéaires ont été construits avec la fonction adonis2 en intégrant l'inoculation (I, N), le stade de développement (d07, d14) et le génotype/année (BostonY1, BostonY2, MajorY1, MajorY2). Les données significatives sont indiquées par une étoile ( $P < 0.05$ ) et le  $R^2$  (variance expliquée) est indiqué.

	Bacteria				Fungi			
	Root		Stem		Root		Stem	
	<i>P</i> -value	$R^2$ (%)	<i>P</i> -value	$R^2$ (%)	<i>P</i> -value	$R^2$ (%)	<i>P</i> -value	$R^2$ (%)
<b>Stage</b>	0.001 *	18.9	0.001 *	18.3	0.001 *	9	0.001 *	10.9
<b>Inoculation</b>	0.001 *	7.9	0.001 *	24.7	0.001 *	6.7	0.001 *	14.4
<b>Genotype/Year</b>	0.376	-	0.542	-	0.759	-	0.1	-

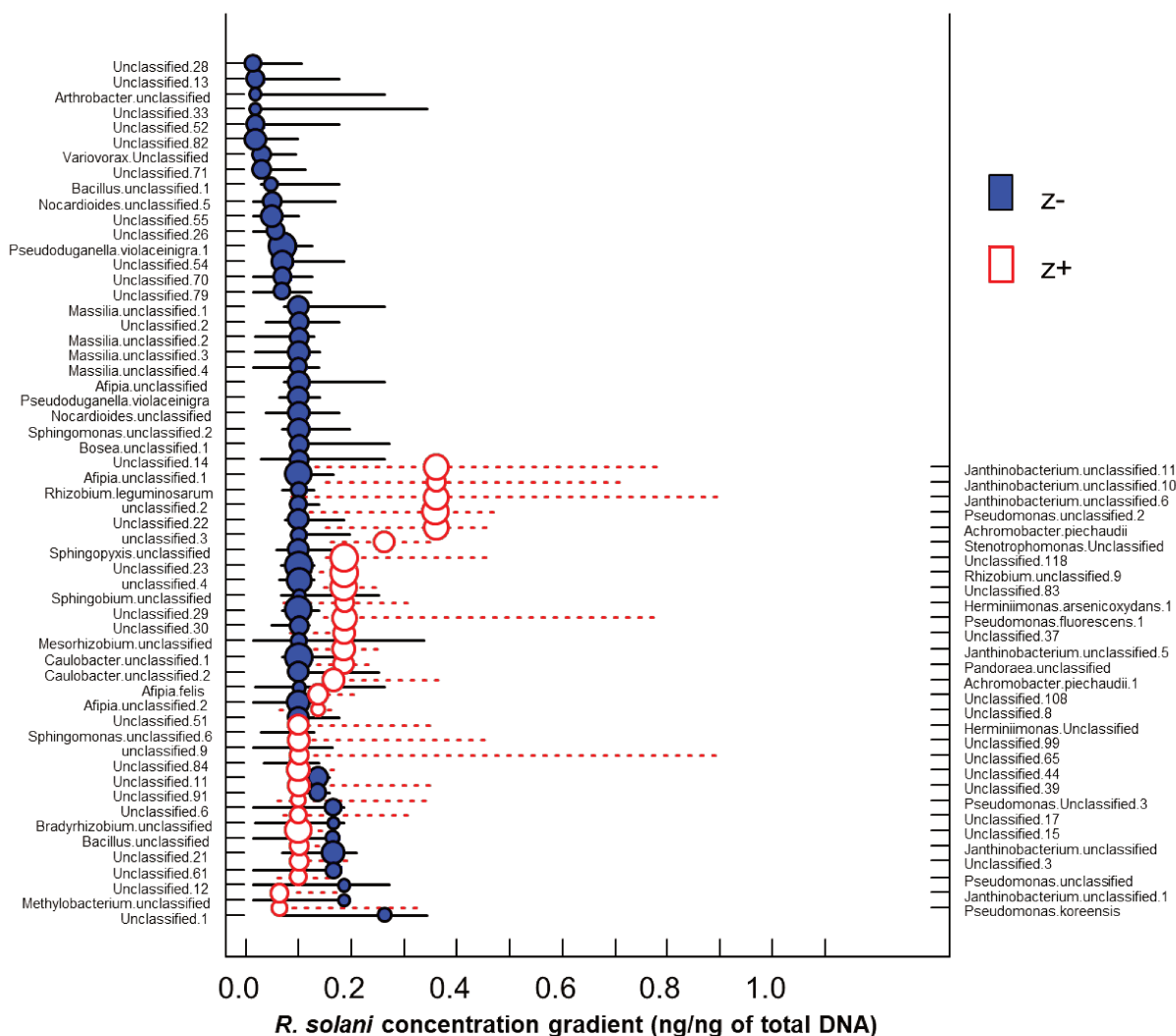


L'inoculation a significativement influencé la richesse bactérienne, notamment dans les tiges à d14 où la richesse est passée de 225 ASV en conditions contrôle (N) à 100 ASV en présence du champignon pathogène (I) (**Tableau 1, Fig. 5A**). La diversité bactérienne était significativement diminuée en présence du champignon pathogène et était en moyenne plus faible dans les tiges que dans les racines (**Fig. 5C**). Il n'y a pas eu d'effet de l'inoculation sur la richesse fongique qui est restée constante ( $P > 0.05$ , **Fig. 5B**). Par contre, il y a eu un effet significatif de l'inoculation sur la diversité fongique ( $P < 0.05$ , **Tableau 1**), qui était plus faible dans les tiges inoculées à d14 (**Fig. 5D**).

En résumé la présence du champignon pathogène induit principalement une diminution de la richesse bactérienne et de la diversité bactérienne et fongique (**Fig. 5**). Pour les champignons, cet effet plus important dans les tiges à d14 n'est pas surprenant si l'on considère la quantité (qPCR) de champignon pathogène retrouvée dans les tiges en comparaison avec celle des racines (**Fig. 4A** – panel de gauche).

Bien que les indices d' $\alpha$ -diversité n'aient révélé aucun effet du génotype sur la diversité microbienne en présence du champignon pathogène, nous avons recherché l'influence du lot de graines sur la structure des microbiotes dans ces conditions. Aucun effet du génotype ni de l'année n'a été révélé sur ces microbiotes, que ce soit dans les racines ou les tiges en condition inoculée ou non (**Fig. 6, Tableau 2**). Par contre l'inoculation avait un effet très structurant sur les communautés bactériennes et fongiques, notamment dans les tiges où la présence du champignon pathogène expliquait 24.7% et 14.4% de la variance, respectivement (**Fig. 6C-D, Tableau 2**).

Finalement, malgré des différences phénotypiques de réponse au champignon pathogène dans le sol High, il n'y a pas de différences de structure et de diversité du microbiote chez les génotypes étudiés. Cependant l'inoculation a un fort impact sur la diversité et la structure du microbiote des plantules. Cet impact fort de l'infection des racines par un champignon pathogène sur la colonisation racinaire du microbiote est très souvent observé (Chapelle *et al.*, 2016). Dans l'étude citée, cet impact a été mis en relation avec la capacité d'un sol suppressif à moduler la pathogénie de *R. solani* sur racines de betteraves. Il serait ainsi intéressant d'identifier les taxons spécifiquement influencés par la présence du champignon pathogène.



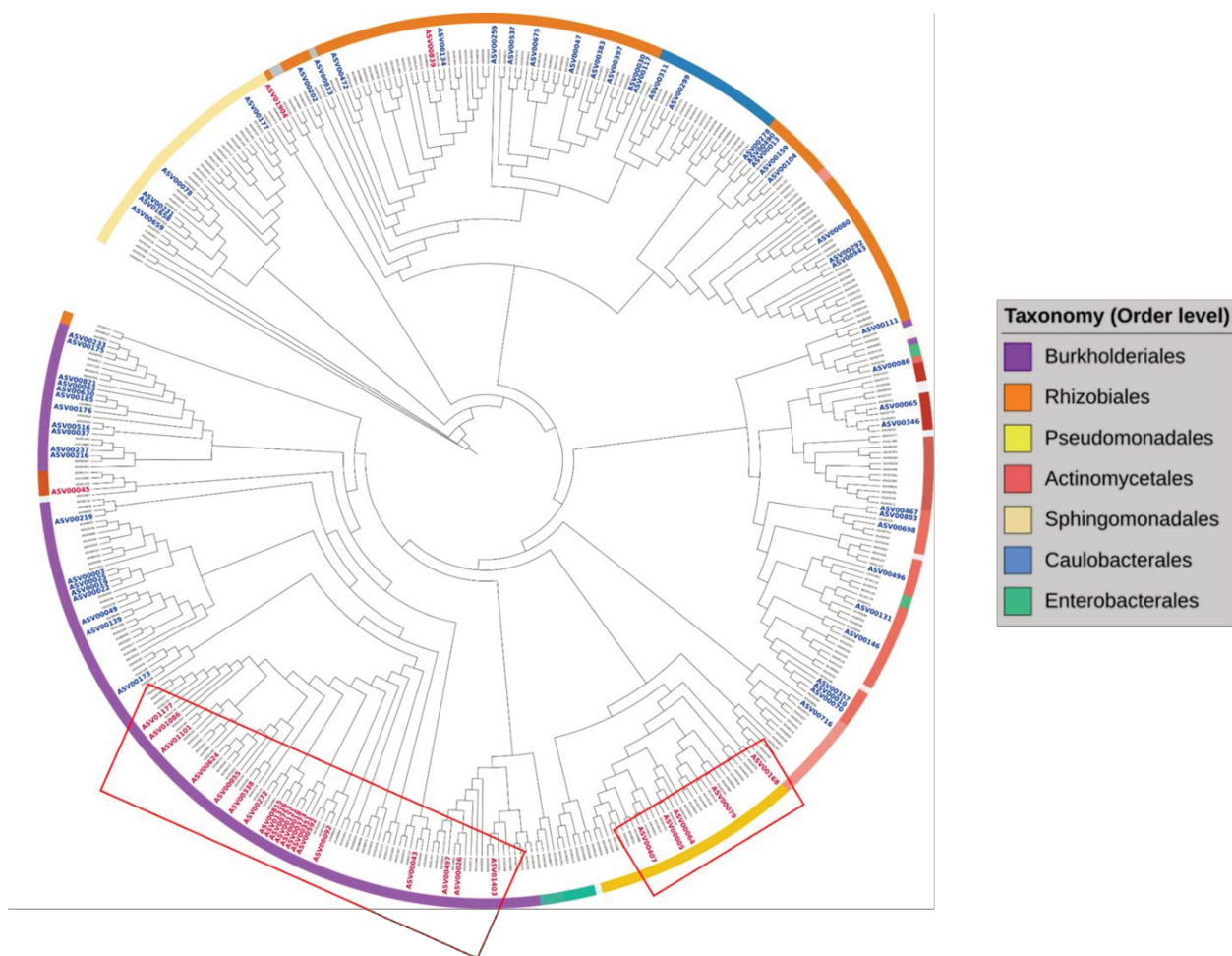
**Figure 7 : Taxons bactériens répondant positivement ou négativement selon un gradient de concentration de champignon pathogène.** Les points bleus représentent les taxons (listés à gauche) dont l'abondance relative diminue (z-). Les points rouges représentent les taxons (listés à droite) dont l'abondance relative augmente (z+). Les lignes horizontales (noires ou rouges pointillées) représentent la fourchette de concentration dans laquelle 95% des changements d'abondance relative ont lieu pour chaque taxon. Analyse réalisée par la méthode TITAN (Baker et King, 2010).

*Effet de R. solani sur l'abondance relative de taxons spécifiques*

Nous avons cherché à identifier les taxons bactériens et fongiques dont l'abondance relative augmente (réponse positive) ou diminue (réponse négative) selon un gradient de concentration de champignon pathogène quantifié sur plantes (racines et tiges), par une analyse TITAN. Cette analyse a été réalisée sur les échantillons de plantules prélevées à d14 dans le sol High. Tout d'abord, une estimation du seuil de concentration pour lequel la majorité des changements ont lieu a été effectuée (**Fig. S4**). C'est au seuil de concentration de 0.1 ng/ng d'ADN total que la majorité des événements négatifs et positifs ont lieu. Cela signifie qu'une concentration très faible de champignon pathogène suffit à provoquer des changements significatifs dans l'abondance relative de certains taxons. Ce seuil est cependant moins précisément fixé pour les réponses positives qui ont lieu de manière assez linéaire à des concentrations variant de 0.1 à 0.2 ng/ng d'ADN total (**Fig. S4**, courbe rouge).

Au total, parmi les 435 ASV bactériens détectés dans les plantules à d14, 60 ASV répondaient négativement et 28 répondaient positivement à la présence du champignon pathogène, de manière significative ( $P < 0.05$ ) (**Fig. 7**). Il y avait donc 2 fois plus de taxons impactés négativement que positivement, ce qui signifie que la présence du champignon pathogène provoque majoritairement une diminution de l'abondance relative des taxons bactériens. Pour chaque taxon dont l'abondance relative diminue, la fourchette de concentration dans laquelle ont lieu ces événements est relativement réduite (**Fig. 7**, lignes horizontales noires). À l'inverse, pour les taxons positivement impactés, leur abondance relative augmente sur une fourchette plus étendue (**Fig. 7**, lignes horizontales pointillées rouges). Cela signifie qu'il existe un seuil précis de concentration de champignon pathogène à partir duquel la réponse est immédiate pour les taxons négativement impactés tandis que les taxons positivement impactés répondent de manière plus aléatoire à différentes concentrations de champignon pathogène. Concernant les champignons, seulement 4 ASV étaient impactés par la présence de *R. solani* (3 négatifs : *Trichocladium asperum*, *Mortierella elongata* et *Chaetomium piluliferum*; 1 positif : *Fusarium*).

Nous avons regardé comment s'organisent les taxons bactériens parmi la diversité phylogénétique de notre jeu de données (**Fig. 8**). Les taxons négativement influencés par la quantité de *R. solani* sont distribués aléatoirement autour de tout l'arbre



**Figure 8 : Organisation des taxons positivement ou négativement impactés par la présence du champignon pathogène parmi la diversité phylogénétique bactérienne des plantules inoculées à d14.** L'arbre phylogénétique a été construit à partir d'une matrice de distance de type Neighbor-Joining avec l'outil en ligne iTOL (Letunic & Bork, 2019). Les taxons négativement impactés sont colorés en bleu, les taxons positivement impactés sont colorés en rouge. Les bandes de couleur extérieures représentent les ordres bactériens.

**Tableau 3 : Origine potentielle des ASVs bactériens positivement et négativement impactés par la présence du pathogène.**

	Negative responders	Positive responders
Soil	45	4
Seed	1	1
Unknown	14	23

phylogénétique, ce qui explique la réduction globale de la diversité bactérienne observée. Par contre, ceux positivement influencés appartiennent très majoritairement à 2 ordres bactériens, les Burkholderiales et les Pseudomonadales, indiquant un fort signal phylogénétique. Parmi ces taxons, 6 appartiennent au genre *Janthinobacterium* (Burkholderiales). Ces taxons sont donc plutôt représentatifs d'une plante malade.

Nous avons ensuite cherché si les taxons positivement impactés trouvaient leur origine de la graine. Parmi les 5 taxons de l'ordre des Pseudomonadales, aucun n'était retrouvé dans les graines, et un seul était partagé avec le sol, les 4 autres étant d'origine inconnue (ou très rares et non détectés) puisque retrouvés ni dans le sol ni dans la graine. De même, les 6 ASV appartenant au genre *Janthinobacterium* n'étaient retrouvés ni dans les échantillons de sol ni dans les échantillons de graines. D'ailleurs, 23 des 28 ASV positivement impactés n'ont pas été isolés dans les échantillons de sol et de graine (origine inconnue) (**Tableau 3**). Par ailleurs, seuls 1 taxon positif impacté (Burkholderiales) et 1 taxon négativement impacté (Sphingomonadales) provenaient des graines. Celui dont l'abondance relative a augmenté en présence du pathogène appartient à l'espèce *Achromobacter piechaudii*, connue comme bactérie promotrice de croissance qui favorise la résistance au stress hydrique chez les Solanacées (Mayak *et al.*, 2004), mais dont le rôle n'est pas établi chez les Brassicacées.

De nombreuses *Pseudomonas* sp. sont définies comme bactéries promotrices de la croissance des plantes (Panpatte *et al.*, 2016) et certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* ont été identifiées comme agents de biocontrôle contre le champignon pathogène *R. solani* chez le riz (Saikia *et al.*, 2006), la tomate (Rini & Sulochana, 2007) mais également contre des isolats de *R. solani* AG2-1 chez le colza (Kataria & Verma, 1992; Alkooranee *et al.*, 2017). Ainsi, l'identification de taxons appartenant au genre *Pseudomonas* et exclusivement identifiés comme positivement impactés par la présence du champignon pathogène est une piste à explorer quant à leur potentiel rôle dans la défense de la plante contre *R. solani*. Sur le même principe, certaines espèces de *Janthinobacterium* produisent de la jagaricine, un peptide antifongique qui s'attaque à la membrane des cellules. L'efficacité de la jagaricine vis-à-vis de plusieurs champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerae*) a été récemment démontrée (Fischer *et al.*, 2019). Il pourrait être intéressant de rechercher si



certaines de ces souches produisent de la jagaricine, et de tester l'effet de cette molécule sur *R. solani*.

L'enrichissement en Burkholderiales et Pseudomonadales peut être relié à la capacité des membres de ces ordres bactériens à exploiter rapidement un grand nombre de métabolites carbonés, et à résister à des stress oxydatifs (Fones & Preston, 2012; Van Acker *et al.*, 2016) générés par l'infection des racines par le champignon pathogène (Foley *et al.*, 2016). Dans le cas ici d'une invasion réussie par le pathogène, on observe une diminution de l' $\alpha$ -diversité et de l'abondance de taxons bactériens très répartis phylogénétiquement, et une augmentation d'un groupe de taxons spécifiques. Il y a donc potentiellement une réduction de la diversité fonctionnelle du microbiote et de sa capacité à exploiter les ressources provenant de la plante saine. Au contraire le parasite invasif déplace la compétition pour les ressources en partie libérées à son avantage (Mallon *et al.*, 2015a,b, 2018). La disparition de taxons diversifiés semble se réaliser très tôt quand il y a peu de parasite, et davantage de taxons spécialisés à potentiel antagoniste apparaissent lorsque la quantité de parasite dépasse un certain seuil. Il existerait donc un trade-off entre cette perte de diversité et cette stimulation de *Burkholderiales* et *Pseudomonadales* médiée par l'afflux de composés carbonés lors de l'infection de la plante par le mycélium. Il serait intéressant de mesurer si une telle structure de microbiote, spécifique de la présence du parasite et déjà résidente, peut réduire ou non l'invasion par *R. solani*.

A ce stade, aucune corrélation n'a pu être établie entre ces résultats et la plus faible expression de maladie sur le géotype Major Y2, ces taxons étant autant retrouvés dans les échantillons Major que dans les échantillons Boston.



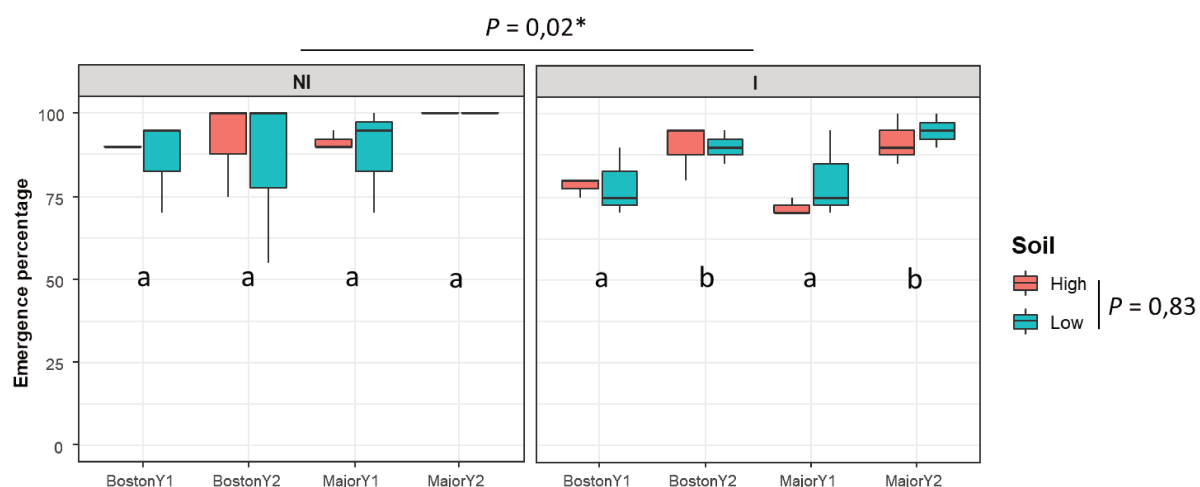


## CONCLUSION

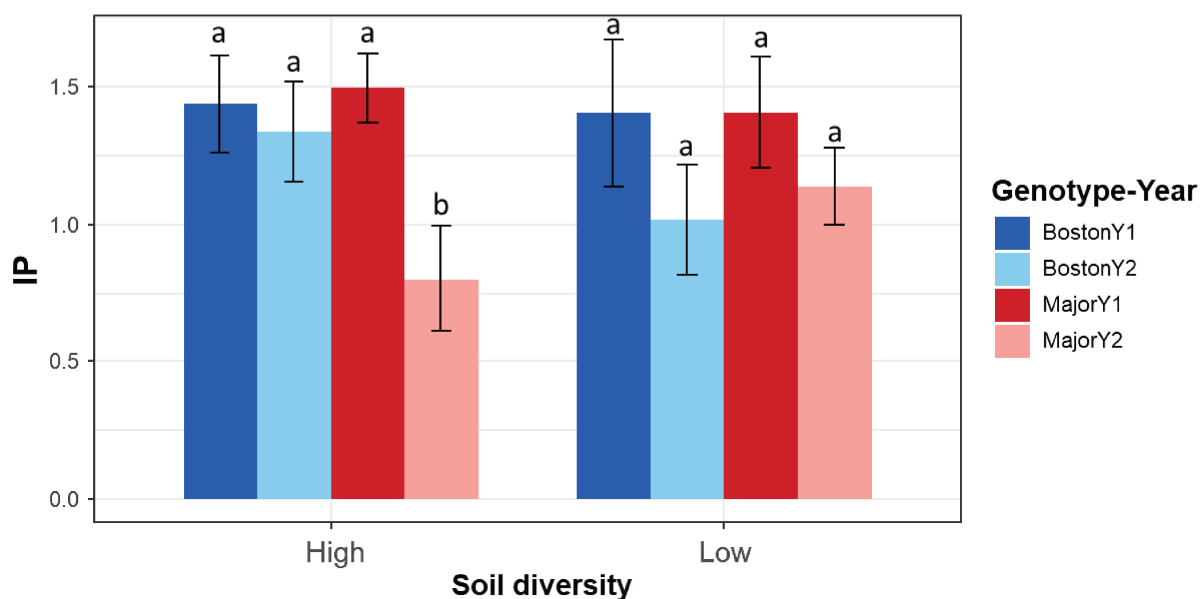
En conclusion, nous avons mis en évidence un effet de l'interaction microbiote x génotype de colza sur la sévérité de la maladie causée par *R. solani* dans le sol de diversité élevée sans pour autant établir de corrélation entre ce phénotype observé et la structure du microbiote des racines et des tiges à deux stades de croissance (d07 et d14). Ces variations d'expression de maladie ne sont pas retrouvées dans un sol de plus faible diversité soit parce que l'invasion du pathogène est contrainte différemment par le microbiote de plus faible diversité, soit parce que les structures initiales du microbiote du sol Low sont plus variables que celles du sol High. La diversité du microbiote des plantules émergées dans le sol High est principalement structurée par la présence du pathogène, notamment dans les tiges. Nous avons d'ailleurs identifié des taxons bactériens plutôt représentatifs d'une plante malade, que l'on peut qualifier d'opportunistes, profitant de l'affaiblissement de la plante pour proliférer et exploiter les niches accessibles du fait de la réduction globale de la diversité bactérienne en présence du champignon pathogène.



**DONNEES SUPPLEMENTAIRES**



**Figure S1 : Pourcentage de plantes émergées dans les témoins (NI) et les inoculées (I) au stade d14.** Les niveaux de significativité entre les génotypes et années sont indiqués par des lettres. Les P-values sont indiquées pour les facteurs « Inoculation » et « Diversité de sol ».



**Figure S2 : Indice pathologique (IP) calculé par génotype et année selon la distribution des classes de symptômes dans chaque sol.** L'IP varie sur une échelle allant de 0 (pas de symptômes) à 3 (très sensible). Les niveaux de significativité entre les lots de graines ( $p < 0,05$ , modèle mixte à lien cumulatif (clmm) sur classes de symptômes cf. Fig. 3) sont indiqués par des lettres.



CLUSTAL Ω (1.2.4) multiple sequence alignment

```

Sanger      AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTTTAATGA      60
ASV503       AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTTTAATGA      60
ASV14       AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTTTAATGA      60
ASV9        AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTTTAATGA      60
ASV12       AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTTTAATGA      60
*****

Sanger      AGAGTTNGGTGTAGCTGGCCCATTCATTTGGGCATGTGCACACCTTCTCTTTTCATCCC      120
ASV503       AGAGTTCGGTGTAGCTGGCCCATTCATTTGGGCATGTGCACACCTTCTCTTTTCATCCC      120
ASV14       AGAGTTCGGTGTAGCTGGCCCATTCATTTGGGCATGTGCACACCTTCTCTTTTCATCCC      120
ASV9        AGAGTTTGGTGTAGCTGGCCCATTCATTTGGGCATGTGCACACCTTCTCTTTTCATCCC      120
ASV12       AGAGTTCGGTGTAGCTGGCCCATTCATTTGGGCATGTGCACACCTTCTCTTTTCATCCC      120
*****

Sanger      ACACACACCTGTGAACCTGTGAGACAGATGGGGAATTTACTTGTGCTTTTTGGAATACA      180
ASV503       ACACACACCTGTGAACCTGTGAGACAGATGGGGAATTTACTTGTGCTTTTTGGAGTTACA      180
ASV14       ACACACACCTGTGAACCTGTGAGACAGATGGGGAATTTACTTGTGCTTTTTGGAATACA      180
ASV9        ACACACACCTGTGAACCTGTGAGACAGATGGGGAATTTACTTGTGCTTTTTGGAATACA      180
ASV12       ACACACACCTGTGAACCTGTGAGACAGATGGGGAATTTACTTGTGCTTTTTGGAATACA      180
*****

Sanger      AAGGCAATAGGTTATTGGACCCTCTGTCTACTCAATTAATATAAACTCAATTTATTTTAA      240
ASV503       AAGGCAATAGGTTATTGGACCCTCTGTCTACTCAATTAATATAAACTCAATTTATTTTAA      240
ASV14       AAGGCAATAGGTTATTGGACCCTCTGTCTGCTCAATTAATATAAACTCAATTTATTTTAA      240
ASV9        AAGGCAATAGGTTATTGGACCCTCTGTCTACTCAATTAATATAAACTCAATTTATTTTAA      240
ASV12       AAGGCAATAGGTTATTGGACCCTCTGTCTACTCAATTAATATAAACTCAATTTATTTTAA      240
*****

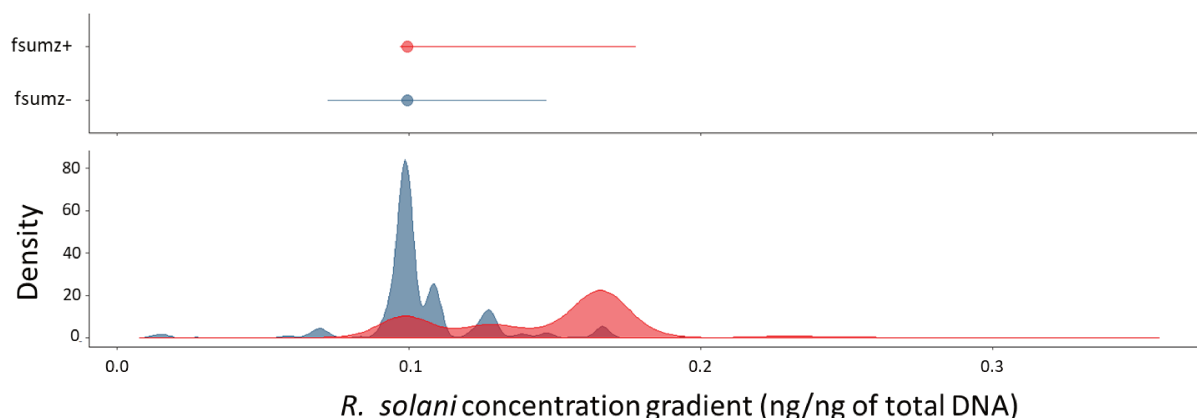
Sanger      AACNAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC      300
ASV503       ACAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC      300
ASV14       ACAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC      300
ASV9        ACGAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC      300
ASV12       ACGAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC      300
*****

Sanger      TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA      360
ASV503       TC-----                                     302
ASV14       TC-----                                     302
ASV9        TC-----                                     302
ASV12       TC-----                                     302
**

```

**Figure S3 : Alignement multiple des ASV de *Rhizoctonia solani* AG2-1 R5 identifiés dans le jeu de données ITS1 et d'une partie de la région ITS1-ITS4 séquencée de la souche (Sanger). L'alignement multiple a été réalisé avec Clustal Ω. Les régions de polymorphisme sont encadrées en rouge. Les ASV 503 et 14 présentent un polymorphisme au niveau du nucléotide 176 (ASV503) et du nucléotide 210 (ASV14).**





**Figure S4 : Seuil de concentration de *R. solani*R5 pour lequel la majorité des changements d'abondance des taxons ont lieu.** Le panel du bas représente la densité d'évènements significativement ( $p < 0,05$ ) positifs ou négatifs en fonction du gradient de concentration. Les pics bleus représentent les évènements négatifs (abondance relative qui diminue) et les pics rouges représentent les évènements positifs (abondance relative qui augmente). Le seuil établi à partir de ces évènements apparaît sur le panel du haut.  $fsumz+$  = concentration moyenne pour la majorité des réponses positives.  $fsumz-$  = concentration moyenne pour la majorité des réponses négatives. Les lignes horizontales représentent la fourchette de concentration dans laquelle 95% des évènements positifs (rouge) ou négatifs (bleu) ont lieu. Représentation obtenue avec l'analyse TITAN.





# CHAPITRE IV

---

**TRANSMISSION DE COMMUNAUTES SYNTHETIQUES  
DE LA GRAINE A LA PLANTULE  
ET IMPACT SUR LE PARASITISME TELLURIQUE**

---



## CHAPITRE IV : TRANSMISSION DE COMMUNAUTES SYNTHETIQUES DE LA GRAINE A LA PLANTULE ET IMPACT SUR LE PARASITISME TELLURIQUE

---

### INTRODUCTION

Au cours des chapitres précédents nous avons observé que la structure initiale du microbiote de la graine peut avoir une influence sur des phénotypes de la plantule comme la cinétique de germination (**chapitre I**) ou bien le développement d'une maladie tellurique (**chapitre III**). Favoriser la croissance de la plante ou diminuer sa sensibilité aux bio-agresseurs par la vexion par la graine de micro-organismes possédant des propriétés de biostimulation ou de biocontrôle est un domaine d'innovation en plein essor (Mitter *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2019).

Afin de s'assurer de la transmission efficace des micro-organismes sélectionnés de la graine à la plante, une meilleure compréhension des processus biologiques impliqués dans la dynamique du microbiote des semences au cours des stades précoces du développement de la plante est nécessaire. En effet, si de nombreux micro-organismes sont associés aux semences, ceux-ci ne sont pas nécessairement transmis aux plantules (*e.g.* Barret *et al.*, 2015 ; Yang *et al.*, 2017 ; Torres-Cortes *et al.*, 2018). Les micro-organismes transmis de la graine aux plantules doivent présenter une grande capacité d'adaptation physiologique aux modifications environnementales (pH, concentration en nutriments et métabolites secondaires) rencontrées lors de la germination et de la levée (Nelson, 2004). Il a été démontré que des fonctions telles que l'adhésion, la résistance au stress osmotique, le quorum-sensing ou la sécrétion d'effecteurs microbiens sont des déterminants clés de la transmission d'agents pathogènes bactériens et fongiques (Darsonval *et al.*, 2008, 2009; Johnson & Walcott, 2013; Pochon *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2015). En revanche le contournement des voies de défenses de la plante ne semble pas être impliqué dans la transmission des micro-organismes de la graine à la plantule puisque les voies dépendantes de l'acide salicylique, l'acide jasmonique et de l'éthylène ne sont pas inductibles lors des phases hétérotrophes de croissance de la plantule de haricot (Darrasse *et al.*, 2010).



Nous avons démontré dans le **chapitre II** que le microbiote des plantules de colza est essentiellement recruté à partir du sol mais que quelques individus associés aux graines ont une persistance élevée dans la plantule. Ces individus transmis de la graine à la plantule ne sont pas nécessairement les plus abondants au sein du microbiote des semences. Cette dernière observation pourrait être expliquée par des déterminants génétiques spécifiques de ces individus qui seraient responsables de leur meilleure fitness lors de la transmission. Étudier plus en détail ces déterminants nécessite tout d'abord de travailler avec des lots de graines possédant une diversité microbienne homogène. Or des variations importantes de composition du microbiote des semences sont observées pour un même génotype produit dans la même parcelle (Rezki *et al.*, 2018; **chapitre I**). Bien que cette variabilité ait été observée au sein d'échantillons élémentaires de 1000 grains, il est fort probable que chaque graine soit en fait colonisée par des taxons distincts (Chesneau *et al.*, données non publiées). Cette grande diversité et variabilité microbienne étant difficile à manipuler, il nous a semblé judicieux de maîtriser la composition microbienne initiale de la graine par inoculation. Nous avons opté pour la reconstruction de communautés synthétiques simplifiées. Par l'utilisation de ces communautés synthétiques (SynCom), leur rôle dans la structuration du microbiote des plantes et dans sa défense contre certains pathogènes a été démontré (Bodenhause *et al.*, 2014; Santhanam *et al.*, 2015; Durán *et al.*, 2018; Carlström *et al.*, 2019). Cependant, bien que l'application consiste souvent à inoculer les graines, les souches composant ces SynCom n'ont jamais été isolées de la graine mais proviennent d'autres organes de la plante, voire du sol. L'utilisation de communautés synthétiques de diversité réduite et isolées de la graine est l'approche que nous avons choisi de mener ici.

Ce chapitre relate donc la démarche entreprise pour obtenir une collection de souches bactériennes isolées de graines et les choix qui ont prévalu pour leur sélection. Ce chapitre est présenté comme une première étape de validation de cette démarche de travail avec des SynCom, et son application ne pourra trouver sa pleine exploitation que par une comparaison de nombreuses SynCom construites à partir de différentes stratégies de sélection, et testées grâce à des techniques de phénotypage à haut débit. Ici, la comparaison de graines inoculées ou non avec deux SynCom de diversité différente nous a permis d'évaluer la persistance de ces inocula sur plantule, d'estimer leur impact sur les communautés microbiennes de la plante à partir de la germination jusqu'au stade plantule, et d'observer l'impact sur une maladie tellurique causée par *R. solani*.



## MATERIEL ET METHODES

### Collection de communautés bactériennes associées aux semences

Des isolats bactériens ont été collectés à partir d'échantillons de graines de 9 géotypes de colza (Astrid, Aviso, Boston, Colvert, Express, Major, Mohican, Tenor, Zorro) récoltées en 2017 (Y2 dans les chapitres précédents). Pour chaque géotype, 2g de semences ont été macérés dans 4 ml de PBS supplémenté en Tween20 (0,05% v/v), pendant 2h30 à 4°C sous agitation constante. Les suspensions ont été diluées en série et étalées sur milieu Tryptic Soy Agar 1/10 (17 g.L<sup>-1</sup> de tryptone, 3 g.L<sup>-1</sup> de peptone de soja, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 5 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar) supplémenté en cycloheximide (50 µg.mL<sup>-1</sup>). Après 7 jours d'incubation à 18°C, 279 colonies par géotype de colza (n = 9) ont été repiquées, à partir de plusieurs boîtes de Petri de densité différente de colonies (10 à 150), en plaques 96 puits contenant 200 µL de Tryptic Soy Broth (TSB). Un contrôle négatif de culture (TSB sans colonie, puits A01), un contrôle positif de culture (une souche de *Lactococcus piscium*, un agent pathogène de poisson que l'on ne retrouve pas au sein du microbiote des plantes, puits H11) et un contrôle négatif de PCR (eau, puits H12) ont été ajoutés dans toutes les plaques (n = 27). Après 5 jours d'incubation des plaques à 18°C sous agitation constante (70 tr/min), 10 µL de suspension bactérienne ont été transférés dans 90 µL d'eau stérile, pour une amplification PCR ultérieure. 190 µL de glycerol à 80% stérile ont été ajoutés dans chaque puits des suspensions bactériennes restantes et les 27 plaques ont été stockées à -80 ° C.

Un typage moléculaire de chaque isolat bactérien a été mené avec la région v4 du gène codant l'ARNr 16S (défini ci-après comme 16S) et une portion du gène *gyrB* selon la procédure décrite par Armanhi *et al.* (2016). Brièvement, chaque jeu d'amorces, 16S (515f/806r; Caporaso *et al.*, 2011) et *gyrB* (*gyrB*\_F64 et *gyrB*\_R353; Barret *et al.*, 2015) a été tagué avec un code-barres unique par plaque. L'amplification par PCR a été réalisée sur une suspension bactérienne bouillie (99°C, 5 min) en utilisant la procédure d'amplification décrite dans le **chapitres I** (voir p. 57). Les produits PCR ont été purifiés avec des billes SeraMag SpeedBead (GE Healthcare) à un rapport de 0,8 produit PCR/billes. Une seconde amplification par PCR a été réalisée avec des amorces contenant un code-barres unique par puits. Les amplicons ont été purifiés, rassemblés en un échantillon unique et séquencés avec une cartouche de réactifs MiSeq v2 (500 cycles).

**Tableau 1 : Souches bactériennes sélectionnées parmi la collection de culture pour la constitution des communautés synthétiques sc1 et sc2.** La concentration (UFC par mL) et l'abondance relative (%) de chaque souche dans les deux SynCom sont indiquées dans le tableau.

N°	Ordre	Genre - Espèce	SC1		SC2	
			UFC/mL	%	UFC/mL	%
1	Enterobacteriales	<i>Pantoea agglomerans</i>	3.72E+07	98.56	1.24E+07	56.8
2	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas</i>	5.45E+05	1.46	1.81E+05	0.83
3	Rhizobiales	<i>Agrobacterium</i>	-	-	4.33E+06	19.84
4	Micrococcales	<i>Frigoribacterium</i>	-	-	4.33E+05	1.98
5	Burkholderiales	<i>Massilia</i>	-	-	1.15E+05	0.53
6	Sphingomonadales	<i>Sphingomonas</i>	-	-	4.37E+06	20.02
<b>Total</b>			3.77E+07	100	2.18E+07	100

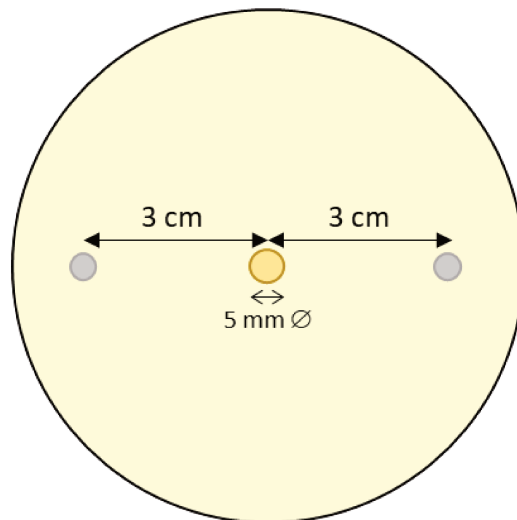


Les fichiers Fastq ont été démultiplexés avec cutadapt version 1.8 (Martin, 2011) et les amorces spécifiques des plaques ont été coupées. Les fichiers Fastq ont été traités avec DADA2 1.6.0 (Callahan *et al.*, 2016) en utilisant les paramètres suivants : truncLen=c(160,150) maxN=0, maxEE=c(1,1), truncQ=5 pour les deux marqueurs taxonomiques. La détection de chimères a été effectuée avec la fonction removeBimeraDenovo implémentée dans DADA2 en utilisant la méthode consensus. Enfin l'affiliation des ASV 16S et *gyrB* a été réalisée avec RDP en utilisant les bases de données silva\_nr\_v132 et train\_set\_gyrB\_v4.fa.gz. Cette dernière base de données contient en plus des séquences *gyrB*, les séquences de *parE*, un paralogue de *gyrB*. Les ASV non affiliés au règne bactérie ou bien associés aux chloroplastes, aux mitochondrie ou à *parE*, ont été retirés du jeu de données. Les analyses de diversité ont été réalisées avec phyloseq 1.22.3 (McMurdie & Holmes, 2013). La correspondance entre les ASV 16S et *gyrB* obtenus par culturomique et les ASV issus du métabarcoding a été obtenue avec le programme BLASTn.

#### Constitution des communautés synthétiques (SynCom)

Des isolats bactériens ont été sélectionnés à travers la collection selon différents critères. L'haplotype de chaque souche devait posséder 100% d'homologie de séquence sur 100 % de sa longueur avec un ASV obtenu par métabarcoding sur graines de colza (cf. **Chapitre I**, Rochefort *et al.*, 2019). Pour chaque souche sélectionnée, l'ASV correspondant devait faire partie du core-microbiote des graines de colza pour l'année 2017 (Y2). Nous avons opté pour deux communautés synthétiques bactériennes de composition réduite et manipulable (**Tableau 1**). Une première communauté de faible diversité (sc1) inclut deux souches (*Pantoea agglomerans* et *Pseudomonas* sp. appartenant au complexe d'espèce *P. putida*) attribuables aux ASV les plus fréquemment associés aux graines des génotypes de colza. Une seconde communauté synthétique (sc2), représente les six ordres bactériens les plus fréquemment retrouvés au sein du microbiote des graines de colza. Cette seconde communauté intègre les deux souches de sc1 et quatre autres souches (*Agrobacterium*, *Frigoribacterium*, *Massilia* et *Sphingomonas*) (**Tableau 1**).

Chaque souche a été mise en culture sur milieu riche LPGA (5 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levures, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptone de viande, 5 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar). Après 3 jours à 27°C, les cultures ont été récupérées par raclage de la gélose avec un râteau et mises en suspension dans 5 mL d'eau stérile. Après mesure de la DO à 600 nm, chaque suspension



**Figure 1 : Dispositif de confrontation des souches bactériennes et du mycélium de *R. solani*.** Les gouttes de suspensions bactériennes (gris) étaient déposées à 3 cm du centre de la boîte de Petri et l'explant de mycélium du champignon (jaune) était déposé 48h après au centre. La croissance radiale du pathogène est observée après 3 jours d'incubation.

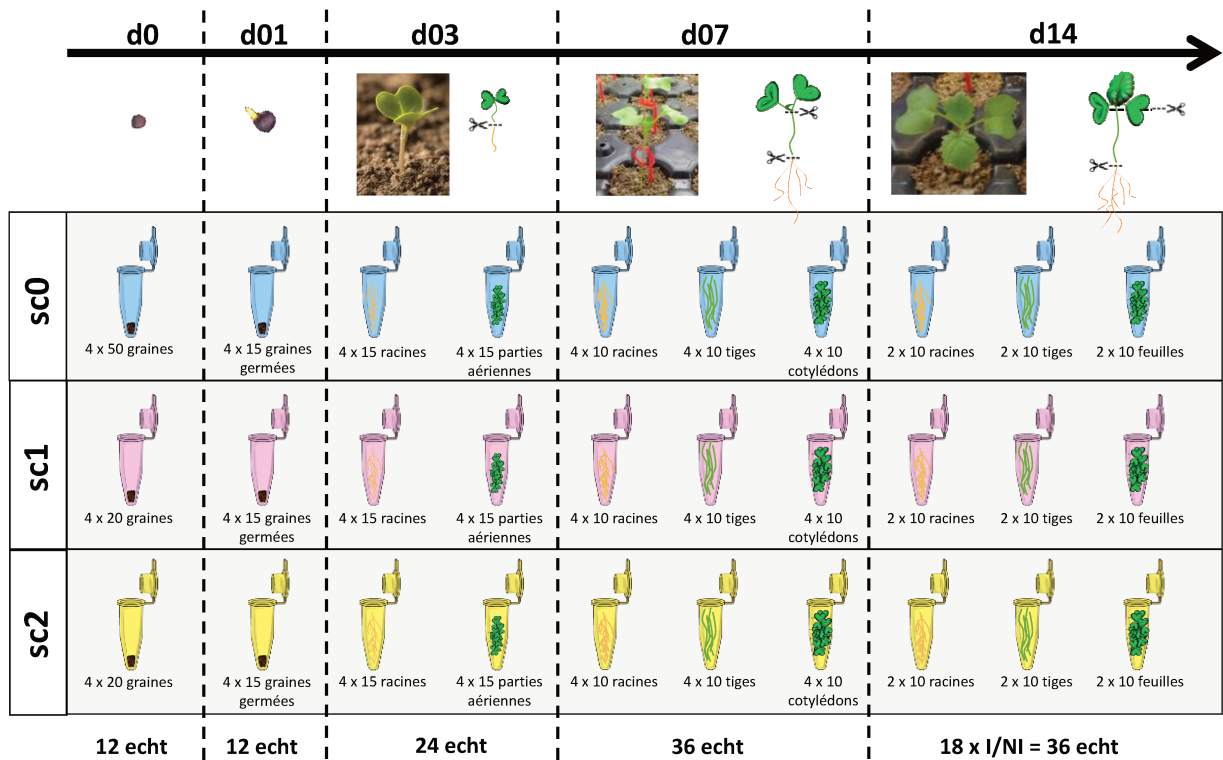
bactérienne a été diluée afin d'obtenir une  $DO_{600}$  finale à 0.05. Pour constituer la sc1, 6 mL de chaque souche 1 et 2 ont été mélangés ( $V_f = 12$  mL). Pour constituer la sc2, 2 mL de chacune des 6 souches ont été mélangés ( $V_f = 12$  mL). En parallèle, une troisième condition contenant seulement de l'eau stérile a été préparée (sc0). La correspondance en concentration finale des souches dans les mélanges sc1 et sc2 est reportée dans le **Tableau 1**. Des différences importantes de concentration bactérienne ont été mesurées (1 : 100) alors que les densités optiques avaient été calibrées. Nous avons profité de ces différences pour tester l'impact de la concentration dans le succès de transmission d'un taxon à la plantule.

#### Tests d'antagonisme des souches bactériennes vis-à-vis de *R. solani* R5

Le champignon *R. solani* R5 a été cultivé pendant 5 jours à 20°C sur milieu Malt agar pH 5,6. Les six souches bactériennes constituant les SynCom ont été cultivées sur milieu gélosé LPGA à 27°C. Après 3 jours, les cultures bactériennes ont été récupérées par raclage de la gélose avec un râtelier et mises en suspension dans 5 mL d'eau stérile. La  $DO_{600}$  a été mesurée et ajustée pour atteindre une DO de 1,5. Pour chaque souche, 2 gouttes de 10  $\mu$ L d'une suspension bactérienne à DO 1,5 ont été déposées à 3 cm de part et d'autre du centre d'une boîte de Petri 90mm contenant du milieu LPGA (**Fig. 1**), en 3 réplicats. Une fois les gouttes séchées les boîtes ont été placées à 20°C. Après 48h, un explant de *R. solani* R5 de 5 mm de diamètre a été prélevé au front de croissance et déposé au centre de chaque boîte de Petri où les gouttes de suspension bactériennes se sont développées. Les boîtes ont été placées à 20°C à l'obscurité. Après 3 jours d'incubation, la croissance radiale du mycélium a été observée.

#### Préparation des graines

Des graines du génotype Major récoltées en 2017 (Y2) ont été stérilisées en surface par trempage pendant 1 min 30 dans l'éthanol à 96° puis 7 min dans l'eau de Javel à 2.4° chlorométrique, et de nouveau 30 sec dans l'éthanol 96°, puis rincées abondamment à l'eau stérile. Une vérification de la stérilité a été effectuée par étalement de la dernière eau de rinçage sur milieu TSA 10% et un sous-échantillon de 6 graines stérilisées a également été déposé sur gélose TSA 10%. Aucune colonie n'a été détectée dans l'eau de rinçage ni sur gélose après germination des graines. 2,7 g de graines stériles (~670 graines) ont été mélangés avec 12 mL de l'une des 2 SynCom (sc1 et sc2) ou de l'eau stérile pour sc0, pendant 15 min sous agitation constante (150 rpm) à T° ambiante. Les graines ont ensuite



**Figure 2 : Plan d'échantillonnage des différents compartiments à chaque stade de développement de la plante et pour chaque traitement SynCom.** Le nombre total d'échantillons prélevés par stade est indiqué en bas de la figure. Ce plan d'échantillonnage a été répété 3 fois indépendamment. Pour les pots inoculés avec *R. solani* R5, l'échantillonnage a été effectué seulement à d14 (distinction I=inoculé et NI=non-inoculé).

été mises à sécher sur papier filtre stérile pendant 15 minutes sous hotte. Immédiatement, 4 x 50 graines de la sc0 et 4 x 20 graines des sc1 et sc2 ont été poolées dans des cryotubes et plongées dans l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C jusqu'à extraction d'ADN (n = 12 échantillons, **Fig. 2**). Le reste des graines a été semé immédiatement (d0).

#### Préparation du sol

La provenance du sol et sa préparation est identique à celle du chapitre II pour l'obtention d'un seul sol de diversité microbienne élevée. Après 28 jours d'incubation, le contenu de tous les sacs a été mélangé puis séparé en 3 parts égales afin d'être utilisé pour 3 répétitions d'expérimentation (A, B et C).

#### Préparation de l'inoculum, inoculation et semis

L'isolat *Rhizoctonia solani* Kühn AG2-1 R5 (Gilligan & Bailey, 1997) a été mis en culture sur un milieu Malt agar (pH 5,6) 6 jours avant inoculation puis repiqué sur une membrane stérile en nitrate de cellulose déposée sur Malt agar 3 jours avant inoculation. Le jour de l'inoculation, des disques de mycélium calibrés (Ø 3mm) ont été découpés au front de croissance du champignon (mycélium jeune), à l'aide d'un emporte-pièce stérile.

Après 28 jours d'incubation du sol, des pots individuels ont été tapissés d'une couche de vermiculite stérile, puis remplis de sol. Le sol a été saturé en eau par le bas un jour avant semis, afin d'atteindre environ 80% d'humidité relative (capacité de rétention) le jour du semis. A d0, avant semis, un disque de mycélium a été déposé à 15 mm de profondeur dans 60 pots et 2 x 10 graines par traitement (sc0, sc1 et sc2) ont été semées individuellement à 5 mm de profondeur, soit à 10 mm de l'inoculum (voir p. 103, **chapitre III – Fig. 2**). Pour chaque traitement SynCom, des graines ont été semées dans des pots non-inoculés avec le champignon pathogène. Les plantes ont été cultivées sous conditions contrôlées (photopériode de 14h jour/10h nuit, 20°C) et à d07, le sol a été arrosé par le bas pour maintenir une humidité relative de 80%.

#### Prélèvements et conservation des échantillons

Le plan d'échantillonnage pour une répétition d'expérience est présenté en **Figure 2**. A d01, 4 x 15 graines germées (GSeed) par traitement (sc0, sc1 et sc2) ont été prélevées dans le sol, chacune trempée brièvement dans de l'eau stérile pour retirer le sol adhérent, avant d'être poolées par 15 (x4) dans des cryotubes et plongées dans l'azote liquide (n = 12 échantillons). A d03, 4 x 15 plantules par traitement ont été prélevées, les parties



racinaires ont été trempées dans de l'eau stérile puis séparées des parties aériennes à l'aide d'un scalpel stérilisé. Les parties racinaires et aériennes ont été poolées séparément par 15 (x4) en cryotubes et plongées dans l'azote liquide (n = 24 échantillons). A d07, 4 x 10 plantules par traitement ont été prélevées, les parties racinaires ont été trempées dans de l'eau stérile puis les plantules ont été séparées en 3 compartiments correspondant aux racines, aux tiges et aux cotylédons. Les 3 compartiments ont été poolés séparément par 10 (x4) en cryotubes et plongés dans l'azote liquide (n = 36 échantillons).

A d14, pour chaque traitement, les plantes levées des 2 x 10 pots inoculés (I) avec le champignon pathogène ont été comptées puis prélevées, les racines ont été trempées brièvement dans de l'eau stérile et les symptômes ont été observés sur bas de la tige selon l'échelle de notation préalablement établie (voir p. 102, **Chapitre III – Fig. 1**). Les plantes levées des 2 x 10 pots non-inoculés (NI) ont été comptées et prélevées, les racines ont été trempées dans l'eau stérile puis toutes les plantes (I et NI) ont été séparées en 3 compartiments (racines, tiges, cotylédons avec feuilles émergentes). Pour chaque condition (I ou NI), les compartiments ont été poolés par 10 (x2) en cryotubes et plongés dans l'azote liquide (3 traitements x 3 compartiments x 2 I/NI x 2 échantillonnages = 36 échantillons) (**Fig. 2**).

A chaque temps (d0, d01, d03, d07 et d14), du sol a été prélevé dans des pots témoins non semés, et échantillonné en cryotubes avant d'être plongé dans l'azote liquide. L'ensemble des échantillons a ensuite été conservé à -80°C jusqu'à extraction d'ADN. L'ensemble des étapes de ce design expérimental (constitution de SynCom, préparation des graines, semis, inoculation et prélèvements) a été répété 3 fois indépendamment, à 3 dates différentes (A, B et C).

#### Construction des bibliothèques d'amplicons, séquençage et traitement

La totalité des échantillons de graines, graines germées, racines, tiges, cotylédons et sol ont été lyophilisés avant extraction d'ADN. Les échantillons ont été mélangés avec des billes en verre stériles de 1mm et 3mm, et les tissus ont été broyés au FastPrep (MP Biomedicals) 2 x 30s à 5m/s. L'ADN a été extrait à l'aide du kit DNeasy PowerSoil HTP 96 (Qiagen). Les bibliothèques d'amplicons ont été construites avec les couples d'amorces gyrB\_aF64/gyrB\_aR553 (Barret *et al.*, 2015) et ITS1F/ITS2 (Buée *et al.*, 2009) en suivant la même procédure que dans les **chapitres I, II et III** (voir p. 57). Les bibliothèques d'amplicons





ont été purifiées, regroupées en un échantillon unique et séquencées avec une cartouche de réactifs MiSeq v3 (600 cycles). Le traitement des fichiers Fastq et l'assignation taxonomique des ASV *gyrB* ont été effectués comme dans la partie culturomique ci-dessus. L'assignation taxonomique des ASV fongiques a été effectuée avec la base de données UNITE v7.1 (Abarenkov *et al.*, 2010). Comme pour les bactéries, les ASV fongiques non assignés au phylum ont été retirés.

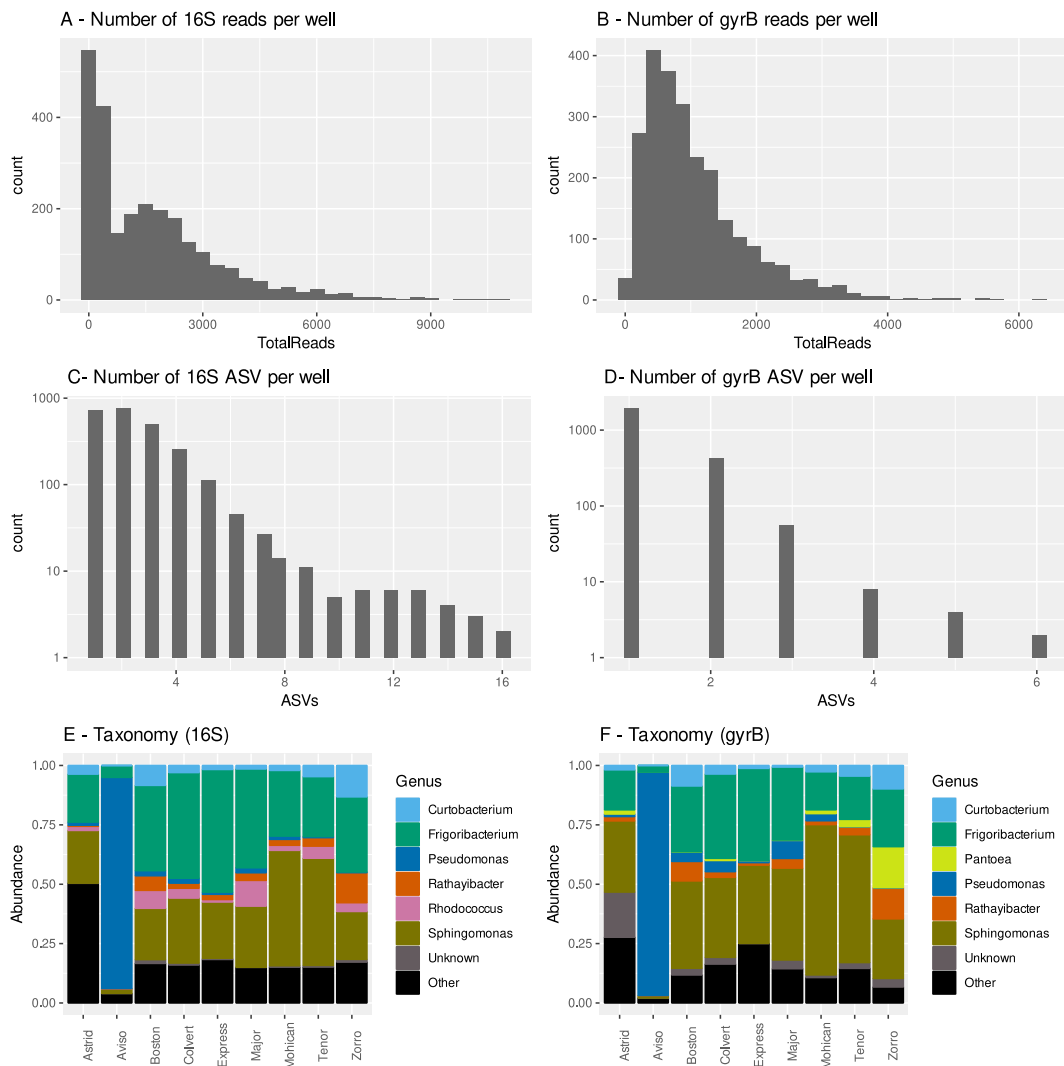
### Analyse des communautés microbiennes

L'ensemble des analyses de diversité a été réalisé avec le package Phyloseq v1.26.0 (McMurdie and Holmes, 2013). Tous les ASV dont l'abondance relative était inférieure à 0.1% ont été retirés du jeu de données. Les échantillons dont la somme des comptages de séquences était  $< 10$  ont également été retirés. Les ASV bactériens correspondant aux souches composant les SynCom ont été identifiés par BLASTn (100 % identité sur 100 % de la longueur). Après visualisation de la profondeur de séquençage et des courbes de raréfaction, la taille des échantillons de plantes a été normalisée à 1000 séquences pour les bactéries et les champignons. A ce seuil, le plateau de richesse n'était pas atteint pour tous les échantillons. La richesse bactérienne et fongique (nombre d'ASV par échantillon) a donc été estimée avec l'indice de Chao1. Une analyse de variance a été effectuée à partir de modèles linéaires et les différences étaient considérées comme significatives à une  $p$ -value  $< 0,05$ . La  $\beta$ -diversité a été visualisée par une analyse en coordonnées principales (PCoA) sur l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis pour les champignons et une matrice UniFrac pondérée (wUF) pour les bactéries (Lozupone & Knight, 2005). Pour quantifier l'effet dû à la nature des échantillons de graines (sc0, sc1 et sc2) sur l'assemblage des communautés microbiennes, une analyse de variance permutative multivariée (PERMANOVA; Anderson, 2001) a été effectuée avec la fonction `adonis2` du package R `vegan` 2.5-6 (Oksanen *et al.*, 2017). Le nombre d'ASV bactériens spécifiques à chaque traitement ou partagés entre les traitements a été déterminé à chaque stade de développement (d01, d03, d07, d14) et présentés sous forme de diagrammes de Venn avec le package `VennDiagram` v1.6.20 (Chen & Boutros, 2011). Afin d'identifier les ASV dont l'abondance relative varie en fonction du traitement SynCom, une analyse DESeq2 a été effectuée sur les échantillons bactériens et fongiques aux stades d01, d03, d07 et d14.

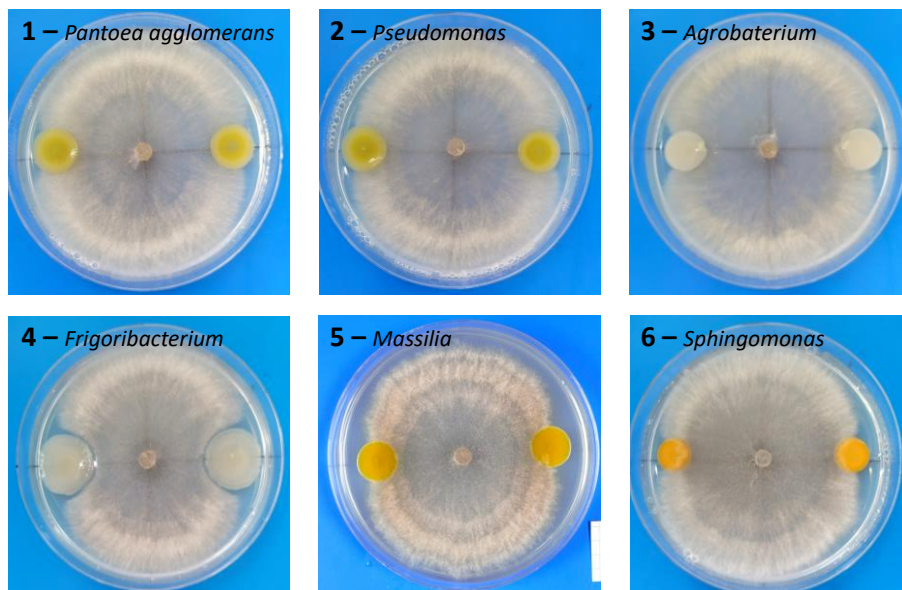


Analyse phénotypique

La sévérité des symptômes à d14 a été analysée par le calcul de la fréquence de chaque classe de symptômes observés pour chaque SynCom. Un modèle à lien cumulatif (clm) incluant la répétition a été effectué pour mesurer la significativité des résultats (effet du traitement SynCom sur la fréquence des symptômes). Une analyse de variance de type II a été effectuée sur ce modèle et les différences étaient considérées comme significatives à une p-value < 0,05. Afin d'identifier les ASV dont l'abondance relative est impactée par la présence du pathogène une analyse DESeq2 a été effectuée sur les échantillons I et NI prélevés à d14.



**Figure 3 : Collection cultivable de communautés bactériennes associées aux graines de *B. napus* identifiées avec 16S (A, C, E) et *gyrB* (B, D, F).** (A, B) Nombre de séquences par puits. (C, D) Nombre d'ASVs par puits. (E, F) Composition taxonomique (au genre) de la collection, par génotype.



**Figure 4 : Confrontation des six souches bactériennes vis-à-vis du champignon pathogène *R. solani* R5.**

## RESULTATS

### Collection d'isolats bactériens

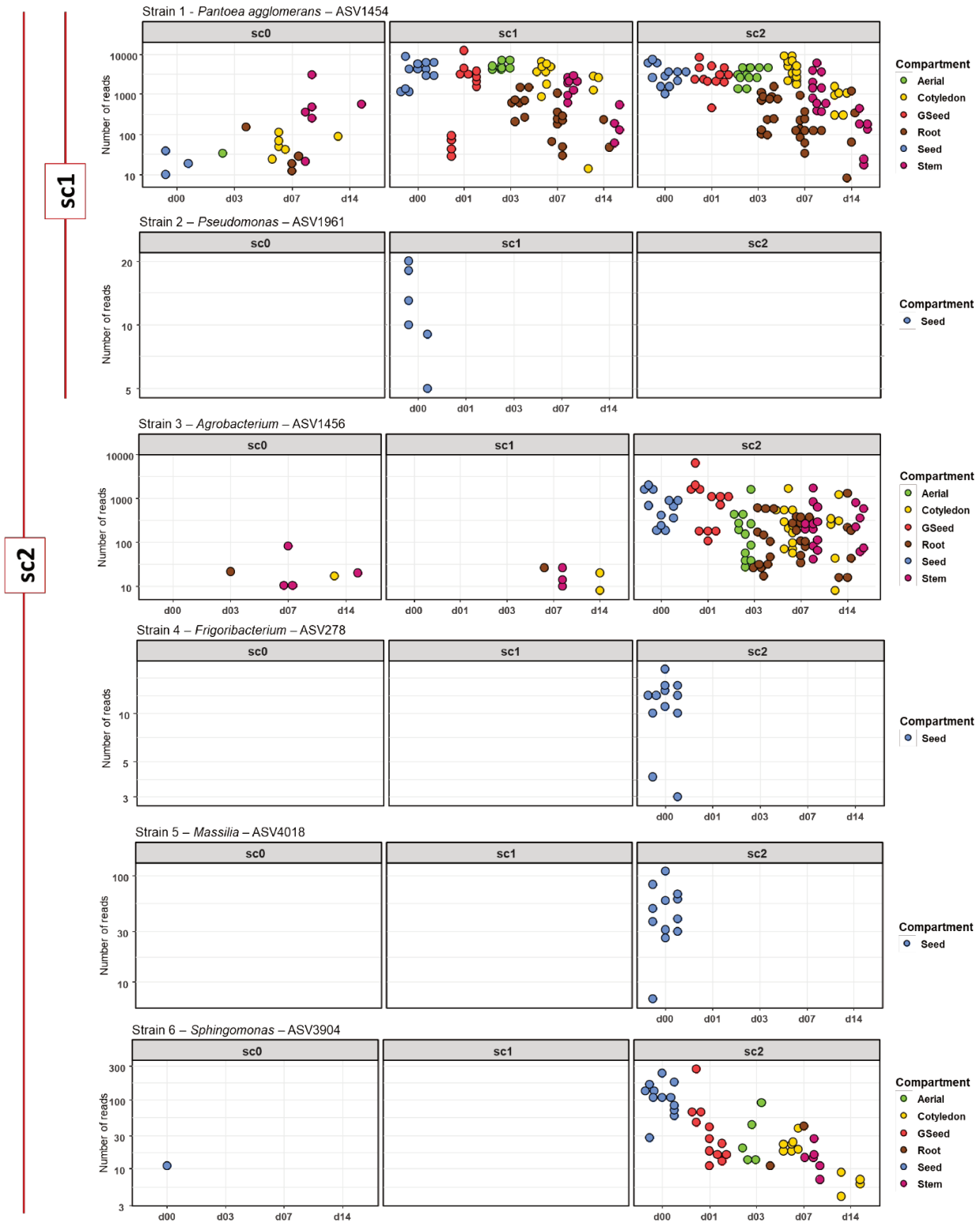
Une moyenne de  $1.10^4$  UFC bactériennes ont été collectées par g de graines par génotype. Un total de 2511 isolats a été collecté (279 par génotype) et amplifié avec les amorces ciblant le gène codant l'ARNr 16S et *gyrB*. Pour 16S, 2494 colonies ont été séquencées avec un nombre de séquences médian de 1222 (min 6, max 10903, **Fig. 3A**). Un total de 863 ASV représentant 138 genres bactériens a été obtenu avec une distribution médiane de 2 ASV par puits (min 1, max 16, **Fig. 3C**). Concernant *gyrB*, 2436 colonies ont été séquencées avec une médiane de 852 séquences (min 3, max 6313, **Fig. 3B**) réparties en 598 ASV et 64 genres bactériens. Une médiane de 1 ASV par puits a été obtenue (min 1, max 6, **Fig. 3D**). Le plus grand nombre d'ASV obtenus par puits avec le marqueur 16S est en partie expliqué par le polymorphisme infra-individu au niveau de la région v4.

Les profils taxonomiques obtenus avec les deux marqueurs au niveau du genre étant relativement proches (**Fig. 3E** et **Fig. 3F**), nous avons opté pour l'utilisation du gène *gyrB* dans la suite de nos analyses. En effet ce gène mono-copie permet de caractériser la diversité taxonomique de nos isolats à un niveau infra-spécifique.

Parmi les 598 ASV *gyrB* obtenus par culturomique, 332 sont identiques aux ASV obtenus par métabarcoding sur les mêmes lots de graines. Cela signifie que 266 ASV n'ont été détectés qu'en culturomique et pas en métabarcoding. Etant donnée la variabilité microbienne entre lots de graines, il n'est pas impossible que certains de ces ASV n'aient pas été présents dans les sous-échantillons de graines utilisés lors de l'analyse métabarcoding (**chapitre I**). D'autre part, il est également envisageable que la culturomique favorise l'isolement de taxons rares du microbiote, non détectés par métabarcoding.

### Antagonisme des souches bactériennes vis-à-vis de *R. solani*

Les tests de confrontation des 6 isolats bactériens avec le champignon *R. solani* R5 ont montré que l'isolat n°4 (*Frigoribacterium*) est antagoniste du pathogène avec un halo d'inhibition visible. Les autres souches n'inhibent pas la croissance du mycélium et ne sont donc pas antagonistes du champignon sur ce milieu nutritif (**Fig. 4**).



**Figure 5 : Identification et abondance des ASVs des souches des communautés synthétiques dans les différents compartiments de la plante au cours du temps.** Traitements : sc0 (aucune souche inoculée), sc1 (souches 1 et 2 inoculées) et sc2 (souches 1 à 6 inoculées) correspondent aux trois traitements sur graines de *B. napus* (génotype Major Y2) stérilisées avant le semis dans le sol. Chaque panel représente le nombre de séquences d'une souche par échantillon en fonction du temps pour chaque traitement SynCom. GSeed = graine germée (Germinated Seed). Attention, l'échelle de l'axe des ordonnées est modifiée pour chaque souche pour faciliter la lecture des données.

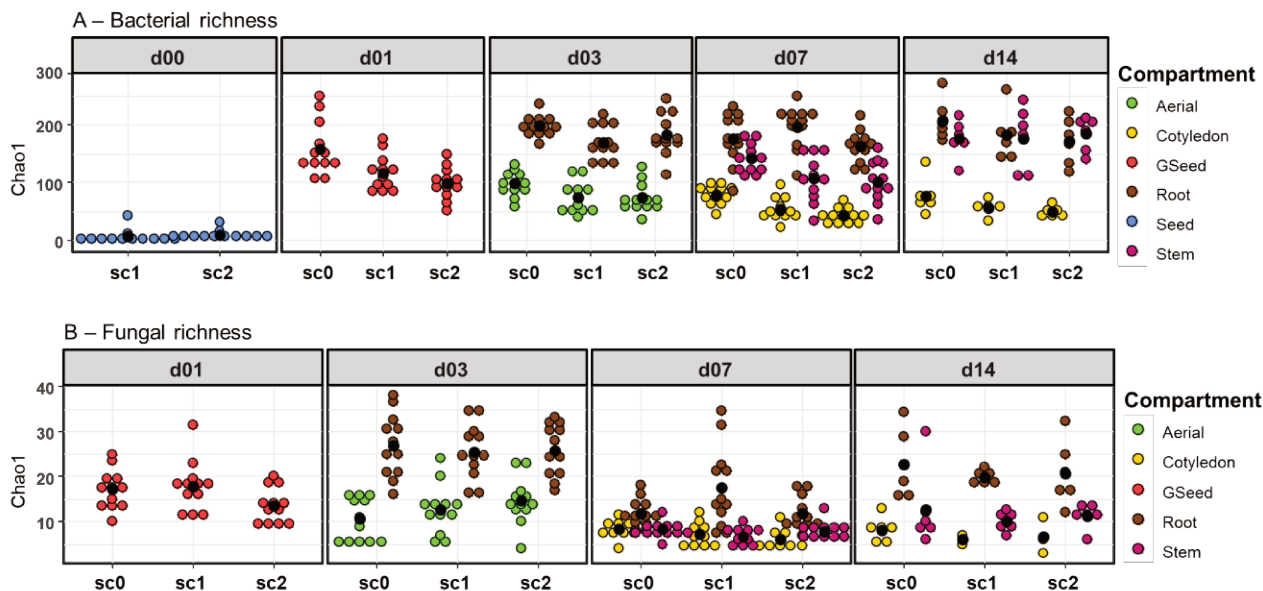
Suivi des souches inoculées lors de la germination-levée

La présence des ASV correspondant aux souches constituant les communautés synthétiques a d'abord été recherchée dans le jeu de données *gyrB*. Pour chacune des 6 souches, un seul ASV avec 100% d'homologie sur la séquence *gyrB* a été identifié. Ces ASV n'ont pas été détectés dans les échantillons de sol (n = 15), ce qui permet de définir la graine en tant que source d'inoculum spécifique de ces ASV.

L'ASV associé à la souche de *P. agglomerans* a été retrouvé en forte abondance (entre 1000 et 10000 séquences) au sein des échantillons des graines inoculées avec sc1 et sc2 (**Fig. 5**). Cet ASV était également présent en abondance plus faible (10-100 séquences) dans 3 échantillons de graines non inoculées et stérilisées en surface (sc0) ce qui confirme que *P. agglomerans* est un taxon fréquemment associé aux graines de colza (Rocheffort *et al.*, 2019). Par ailleurs la détection de *P. agglomerans* dans des graines stérilisées en surface (3 échantillons sur 12) indique que cette bactérie pourrait être potentiellement localisée dans l'endosperme ou en surface de l'embryon, mais on ne peut pas non plus exclure des contaminations croisées entre traitements SynCom. D'après nos données de metabarcoding, *P. agglomerans* est transmise de manière efficace de la graine à la plantule et se retrouve préférentiellement au niveau des cotylédons (**Fig. 5**). Lors des traitements sc1 et sc2, l'ASV associé à la souche de *P. agglomerans* est détecté en abondance dans la totalité des échantillons de graines germées (d01) et de plantules (d03, d07 et d14) ce qui signifie que l'inoculation de cette souche sur graines permet sa transmission efficace aux plantules.

L'ASV correspondant à *Pseudomonas* dans sc1 et sc2 a été retrouvé en très faible abondance (< 20 séquences) dans les échantillons sc1 et n'a pas été détecté dans les échantillons sc2 (**Fig. 5**). Cet ASV n'a pas non plus été détecté dans les échantillons de graines germées et plantules. Il est probable que la densité cellulaire d'inoculum employée ait été trop faible (**Tableau 1**) pour son installation au sein des échantillons de semences et sa transmission à la plantule.

L'ASV correspondant à la souche d'*Agrobacterium* a colonisé avec succès les graines des échantillons sc2 (entre 100 et 1000 séquences) et se transmet efficacement aux plantules aussi bien dans les parties aériennes que racinaires (**Fig. 5**). Quelques séquences (10-100) de cet ASV ont été détectées dans des parties aériennes (peu d'échantillons) des plantules issues des échantillons sc0 et sc1. Ces séquences pourraient être soit issues de



**Figure 6 : Influence du traitement des graines sur la richesse bactérienne (A) et fongique (B) des graines et plantules au cours du temps.** Traitements : sc0 (eau), sc1 (souches 1 et 2) et sc2 (souches 1 à 6). La richesse a été estimée avec Chao1 pour chaque SynCom à chaque stade de développement. Les compartiments de plante sont distingués par les couleurs. GSeed = graine germée (d01). Les points noirs représentent la moyenne.

**Tableau 2 : Analyse de variance effectuée sur la richesse microbienne estimée avec Chao1.** Des modèles linéaires intégrant la nature de l'échantillon de graine (sc0, sc1 et sc2), le stade de développement (d0, d1, d3, d7 et d14) et le compartiment de plante (cotylédons, tiges, racines) ont été construits. Les valeurs significatives sont indiquées par une étoile ( $P < 0.05$ ).

	<b>Bacterial richness</b>	<b>Fungal richness</b>
<b>SynCom</b>	1.13 .10 <sup>-10</sup> *	0.475
<b>Stage</b>	2.2 .10 <sup>-16</sup> *	2.2 .10 <sup>-16</sup> *
<b>Compartment</b>	2.2 .10 <sup>-16</sup> *	2.2 .10 <sup>-16</sup> *



populations d'*Agrobacterium* associées aux graines du génotype Major ou bien plus vraisemblablement issues de la dispersion par voie aérienne de la souche inoculée dans sc2 ou de contaminations croisées lors du passage des échantillons en plaques 96 puits.

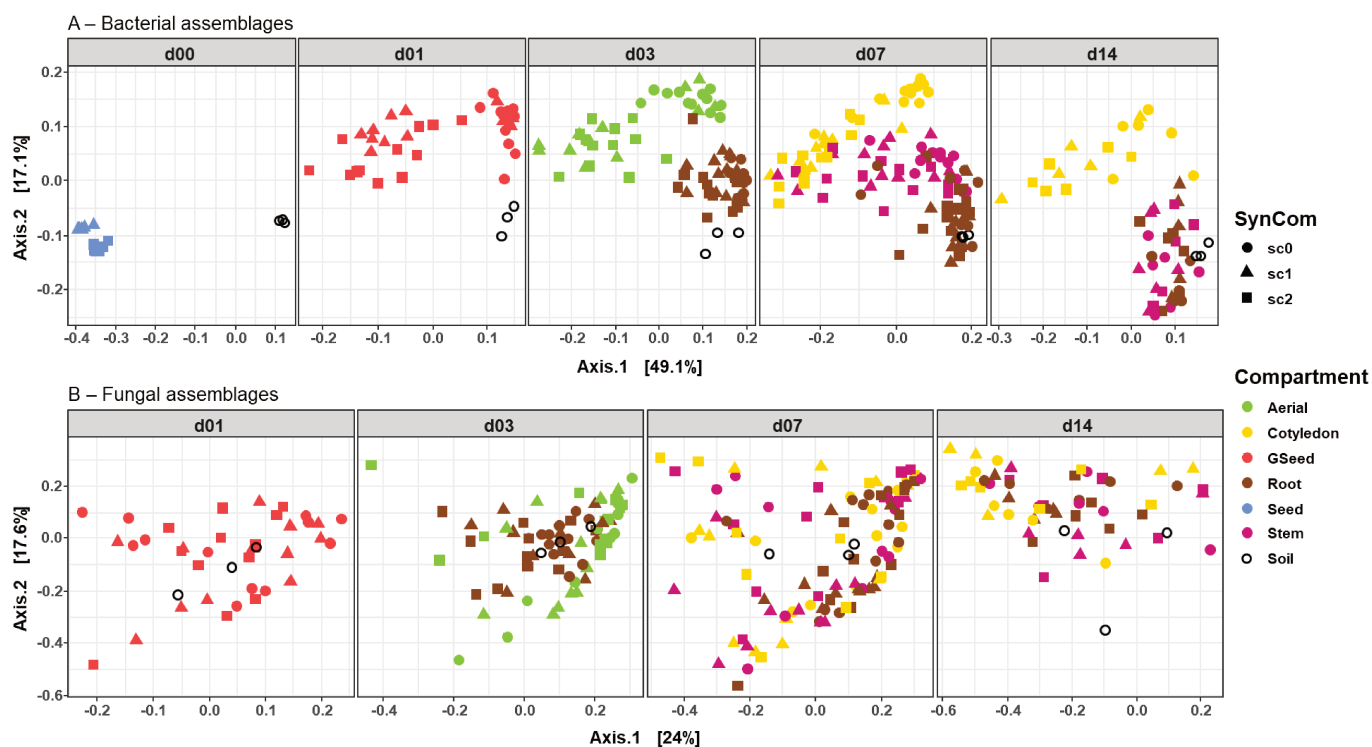
Les ASV associés aux souches de *Frigoribacterium* et *Massilia* ont seulement été détectés sur les échantillons de graines sc2 mais n'ont pas persisté sur les graines germées et plantules (**Fig. 5**). Il est probable que la taille d'inoculum initiale de ces souches n'ait pas permis une transmission efficace aux graines germées et plantules.

Enfin, l'ASV correspondant à la souche de *Sphingomonas* a été détecté en abondance moyenne (< 300 séquences) à d0 sur graines sc2 (**Fig. 5**). Son abondance a graduellement diminué au cours du développement de la graine pour se retrouver à une dizaine de séquences dans les cotylédons des plantules d14. La taille d'inoculum initiale de *Sphingomonas* étant comparable à celle d'*Agrobacterium* (**Tableau 1**), les différences de colonisation observées entre ces deux Alphaprotéobactéries pourraient traduire des différences d'efficacité de transmission de la graine aux plantules.

En résumé les graines germées et plantules issues de sc1 et sc2 sont colonisées par une (*P. agglomerans*) et trois souches (*P. agglomerans*, *Agrobacterium* et *Sphingomonas*) inoculées (**Fig. 5**). Par ailleurs il semble que la taille initiale d'inoculum soit un facteur clé dans la transmission aux plantules. S'il est difficile de généraliser nos observations avec seulement six souches utilisées dans ces premières expériences, il semble qu'un inoculum à minimum  $10^6$  UFC par ml soit nécessaire pour assurer une transmission efficace de la bactérie inoculée. Des résultats antérieurs obtenus avec la bactérie phytopathogène *X. citri* pv *fuscans* avaient déjà identifié la taille de population comme un élément clé de la transmission de cette bactérie aux plantules de haricot (Darrasse *et al.*, 2007). Gao *et al.* (2020) soulignent aussi que la proportion finale des individus d'une communauté bactérienne dépend fortement des proportions initiales du mélange et qu'il est difficile de prévoir la proportion finale malgré la connaissance des préférences métaboliques différentes de chaque individu.

#### Effet des communautés synthétiques sur la richesse et la diversité microbienne

Le traitement initial des graines (sc0, sc1 et sc2) a un effet significatif sur la richesse bactérienne ( $P < 0.05$ ) (**Tableau 2**). C'est au stade d01 (graines germées) que la richesse bactérienne est significativement impactée ( $P = 0.02$ ) avec plus d'ASV détectés



**Figure 7 : Cinétique de l'influence du traitement des graines sur la structure du microbiote des graines et plantules.** Une analyse en coordonnées principales (PCoA) des distances UniFrac pondérées (A) et des indices de Bray-Curtis (B) a été réalisée pour les bactéries (A) et les champignons (B). Les symboles représentent le traitement SynCom (sc0 (eau), sc1 (souches 1 et 2) et sc2 (souches 1 à 6)) et les couleurs représentent les différents compartiments. Les cercles noirs représentent les 3 échantillons de sol échantillonnés par stade de développement (d00 (graines), d01 (graines germées, GSeed), d03 (racines, parties aériennes), d07 (racines, tiges, cotylédons), d14 (racines, tiges, cotylédons)).

**Tableau 3 : Analyse de variance multivariée permutative (PERMANOVA) sur les indices de  $\beta$ -diversité microbienne.** Des modèles linéaires ont été construits avec la fonction adonis2 en intégrant la nature de l'échantillon de graine (sc0, sc1 et sc2), le stade de développement et le compartiment de plante. Les données significatives sont indiquées par une étoile ( $P < 0.05$ ) et le  $R^2$  (variance expliquée) est indiqué.

	Bacteria		Fungi	
	P-value	$R^2$	P-value	$R^2$
<b>SynCom</b>	0.001*	11.6%	0.017*	1%
<b>Stage</b>	0.001*	7%	0.001*	9%
<b>Compartment</b>	0.001*	44.7%	0.001*	7%

**Tableau 4 : Analyse de variance multivariée permutative entre communautés bactériennes en fonction du stade de développement.**

	d00	d01	d03	d07	d14
<b>sc0 vs sc1</b>	-	0.0015*	0.0114*	0.0079*	0.2730
<b>sc0 vs sc2</b>	-	0.0015*	0.0015*	0.0015*	0.0360
<b>sc1 vs sc2</b>	0.0015*	0.0184	0.2254	0.2311	0.3310

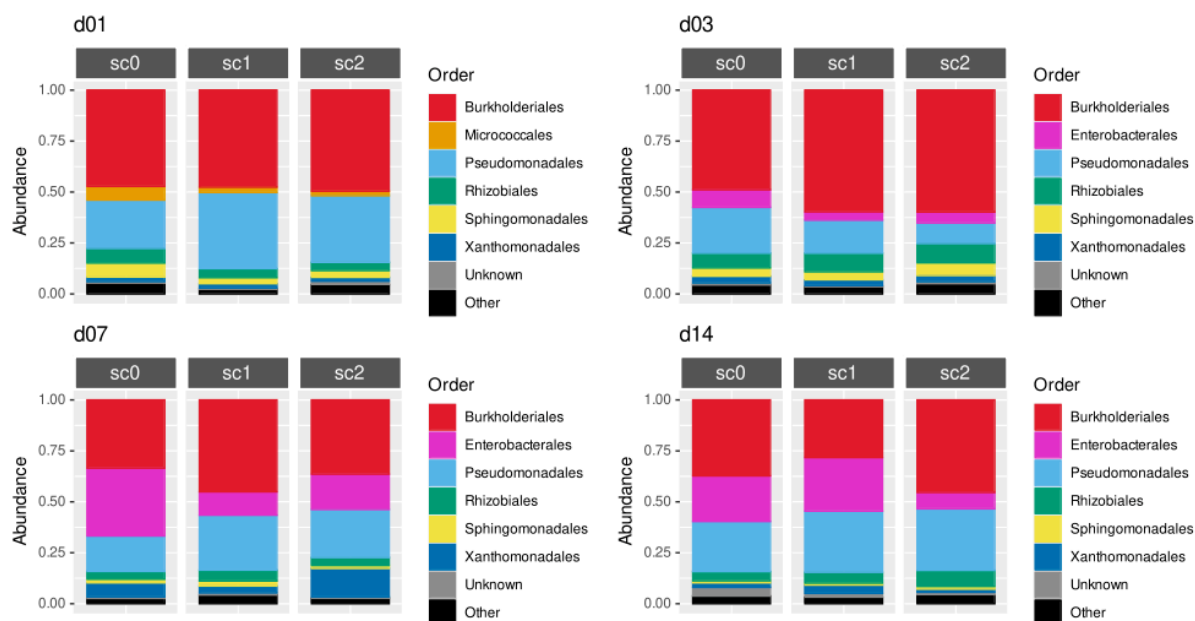
(en moyenne 160) dans les échantillons sc0 que dans sc2 (en moyenne 100 ASV, **Fig. 6A**). Ces résultats suggèrent que des graines déjà colonisées en surface par des membres des communautés inoculées (sc1 et sc2) sont potentiellement plus résistantes à l'invasion des micro-organismes du sol que les graines non-inoculées (sc0). Cependant d'après les niveaux de richesse estimée cette résistance à l'invasion est éphémère et ce n'est plus significatif après le stade graine germée (d01). Aucun effet significatif de la nature de l'échantillon de graine n'a été observé sur la richesse fongique quel que soit le stade de développement. Cette dernière variait significativement en fonction du stade de développement et du compartiment (**Tableau 2**). Le nombre moyen d'ASV bactériens variait entre 50 et 200 et le nombre d'ASV fongiques entre 10 et 30 en fonction du compartiment, les racines étant en général plus riches que les parties aériennes (**Fig. 6A**). Après stérilisation des graines en surface et quel que soit le traitement SynCom, aucun champignon n'a été détecté au stade d0 (**Fig. 6B**). Cela signifie qu'après stérilisation de surface des graines, les champignons ont été éradiqués, ou le nombre de séquences fongiques était sous le seuil imposé par la raréfaction (1000 séquences).

L'impact de la nature de l'échantillon de graines sur la structure du microbiote des plantes a ensuite été évalué au cours de son développement. Les échantillons de sol ont été inclus dans le calcul des distances UniFrac pondérée (composante bactérienne) et Bray-Curtis (composante fongique) pour la représentation de la PCoA (**Fig. 7**) mais ont été retirés pour le calcul des PERMANOVA (**Tableau 3**). Pour les bactéries, au stade d0, les échantillons de sol et de graines étaient bien séparés par l'axe horizontal puis au cours du développement de la plante les communautés microbiennes des racines et des tiges ont convergé vers les communautés du sol tandis que les communautés des cotylédons avaient une structure significativement différente (**Tableau 3, Fig. 7A**). Les profils de communautés fongiques étaient moins marqués entre compartiments et ce facteur n'expliquait que 7% de la variance (**Tableau 3, Fig. 7B**).

La nature de l'échantillon de graines a un effet significatif sur la structure des communautés bactériennes des plantules. En effet, ce facteur expliquait 11.6% de la variance observée dans les plantules (**Tableau 3**). Une interaction significative entre le stade de développement de la plante et la nature de l'échantillon de graines a également été mise en évidence (**Tableaux 3 et 4**). Aux stades d01, d03 et d07, des différences significatives de composition ont été observées entre les graines non inoculées (sc0) et

**Tableau 5 : Nombre d'ASV dont l'abondance relative (RA) est modifiée en fonction du traitement initial des graines.**

Stage	Contrast	Bacterial ASVs		Fungal ASVs	
		Increase RA	Decrease RA	Increase RA	Decrease RA
d01	sc0_vs_sc1	36	10	1	0
	sc0_vs_sc2	46	1	1	0
	sc1_vs_sc2	14	1	1	0
d03	sc0_vs_sc1	21	2	2	2
	sc0_vs_sc2	21	3	1	3
	sc1_vs_sc2	8	9	2	1
d07	sc0_vs_sc1	19	1	2	4
	sc0_vs_sc2	20	2	4	2
	sc1_vs_sc2	4	5	2	3
d14	sc0_vs_sc1	15	20	4	4
	sc0_vs_sc2	17	17	6	6
	sc1_vs_sc2	12	9	4	5



**Figure 8 : Abondance relative des ASV bactériens impactés par le traitement initial des graines.**

les graines inoculées avec sc1 et sc2 (**Tableau 4**). L'impact des deux SynCom ne perdure pas après d07 car aucune différence significative n'a été observée après ce stade. D'après nos données, la différence de diversité initiale employée dans nos deux SynCom ne conduit pas à des différences significatives de composition du microbiote (**Tableau 4**). Il est donc possible que l'effet observé sur la structure du microbiote entre graine inoculées et non-inoculées soit principalement dû à la présence de *P. agglomerans* qui s'est maintenue dans les deux communautés sc1 et sc2. L'analyse de l'interaction entre le compartiment et la nature de l'échantillon de graines n'a pas révélé de différences significatives entre compartiments. Malgré un effet significatif de la SynCom ( $P = 0.017$ ) sur la structure des communautés fongiques, ce facteur n'expliquait que 1% de la variance observée, et les interactions deux à deux des SynCom à chaque stade n'étaient pas concluantes (données non montrées).

#### Impact du traitement initial SynCom sur les taxons microbiens

L'impact des traitements sc0, sc1 et sc2 sur l'abondance relative des ASV a été analysé avec DeSeq2. En plus des 3 ASV correspondant aux souches inoculées (*P. agglomerans*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*) 172 ASV bactériens et 29 ASV fongiques présentaient des modifications significatives ( $P < 0.01$ ,  $\log_2FC > |2|$ ) d'abondance relative entre traitements SynCom (**Tableau 5**). L'abondance relative de nombreux ASV bactériens diminuait dans les échantillons inoculés avec sc1 et sc2 en comparaison avec les échantillons non-inoculés (sc0) jusqu'à d07 (**Tableau 5**).

Cette diminution d'abondance relative était cohérente avec les diminutions de richesse observées dans les échantillons inoculés (**Fig. 6**). Afin de savoir si certains groupes taxonomiques étaient particulièrement impactés par les inoculations avec sc1 et sc2, les ASV bactériens dont l'abondance relative était significativement modifiée ont été regroupés au niveau de l'ordre (**Fig. 8**). Les échantillons inoculés avec sc1 et sc2 limitent la colonisation de la spermosphère (d01) par les Micrococcales et les Pseudomonadales lors de la levée (d03). Des fluctuations d'abondance relative entre échantillons sont également observées pour les Burkholderiales, Enterobacterales et Xanthomonadales mais ces changements varient en fonction du stade de développement (**Fig. 8**). Le faible nombre de taxons fongiques dont l'abondance relative était impactée par l'inoculation de sc1 et sc2 ne nous a pas permis de faire ces analyses au niveau de l'ordre. On peut toutefois

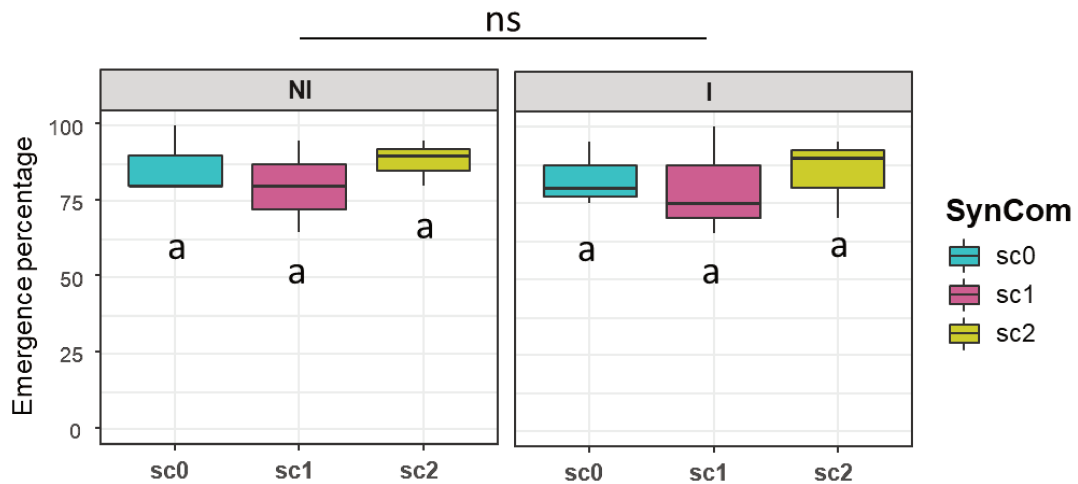


Figure 9 : Comparaison du pourcentage de plantes levées dans les témoins (NI) et les plantes inoculées (I) au stade d14 en fonction du traitement SynCom des graines.

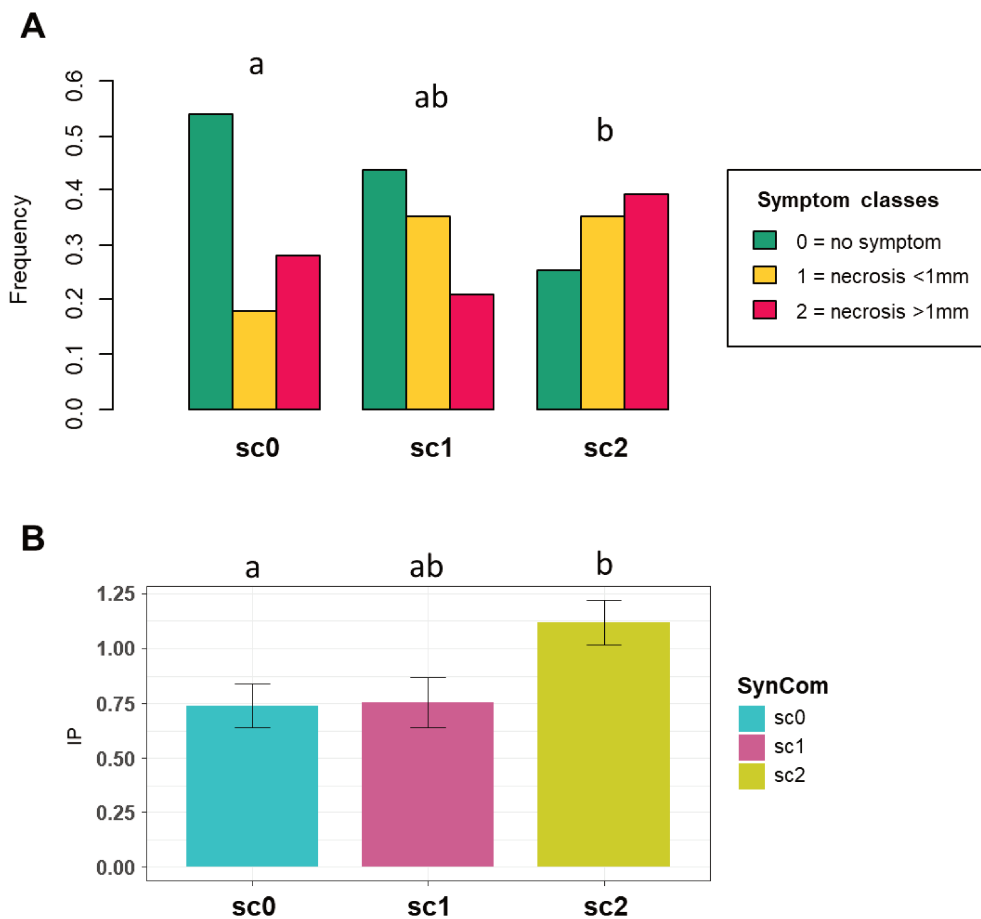


Figure 10 : Influence du traitement des graines sur la maladie provoquée par le champignon pathogène *R. solani* R5. (A) Fréquences de symptômes en fonction du traitement SynCom. Les classes de symptômes ont été notées sur le bas de la tige à d14 et établies selon l'étendue de la nécrose. Les niveaux de significativité entre les traitements SynCom sont indiqués par des lettres (clmm,  $p < 0,05$ ). (B) Indice pathologique (IP) calculé selon la distribution des classes de symptômes. L'IP varie sur une échelle allant de 0 (pas de maladie) à 3 (gravité maximale) (clmm,  $p < 0,05$ ).

noter que 8 ASV affiliés à *Fusarium* et 7 ASV affiliés à *Mortierella* présentaient des modifications d'abondance relative en fonction de la nature de l'échantillon de graine.

*Effet des communautés synthétiques sur la maladie causée par R. solani*

La réponse de la plante à la maladie provoquée par le champignon pathogène *R. solani* AG2-1 R5 a été mesurée à d14. Pour cela, des classes de symptômes ont été attribuées selon une échelle préalablement établie (**chapitre III**). Pour évaluer le nombre de plantes de classe 3, il fallait se rapporter au pourcentage de levée dans les témoins (**Fig. 9**). Aucune différence de levée n'a été identifiée entre les plantes inoculées et les plantes témoins, ni entre les traitements SynCom (environ 85% de levée dans toutes les conditions). Ainsi, aucune plante non levée n'était due à l'inoculation du champignon pathogène, il n'y avait donc pas de symptômes de classe 3 attribuables à la maladie dans cette étude.

Des différences significatives de distribution des classes de symptômes ont été mises en évidence entre les plantes sc0 et les plantes sc2. En effet plus de 50% des plantes sc0 étaient asymptomatiques contre seulement 25% chez les plantes sc2 (**Fig. 10A**). De plus, presque 40% des plantes sc2 présentaient des nécroses étendues contre 20% en sc1 et 30% en sc0, et l'indice pathologique correspondant à ces plantes était plus élevé que celui des plantes sc0 (**Fig. 10B**). Les plantes sc2 étaient donc significativement plus sensibles au champignon pathogène que les plantes sc0 ( $P < 0.05$ ). On observe un gradient de gravité de maladie de sc0 à sc2, avec le traitement sc1 en situation intermédiaire, pas significativement différent des deux autres traitements ( $P > 0.05$ , **Fig. 10A**).

Les différences de symptômes observées peuvent être corrélées à la richesse bactérienne des premiers stades de développement de la plante. En effet, à d01, la richesse bactérienne était significativement plus élevée dans les graines germées sc0 comparativement à la richesse bactérienne dans les graines germées sc2 (**Fig. 6A**). Une richesse plus importante sur graine germée suggère une plus forte compétitivité vis-à-vis du champignon pathogène déjà présent dans le sol et le champignon pathogène serait alors moins agressif. Dans ces conditions sc0, la graine germée a un potentiel de recrutement de diversité bactérienne plus grand et peut associer potentiellement davantage de fonctions microbiennes impactant son phénotype : production d'hormones

**Tableau 6 : ASV bactériens et fongiques dont l'abondance relative est enrichie (+) ou diminuée (-) suite à l'inoculation de *R. solani* dans le sol.** Les taxons fongiques grisés sont les 4 ASV correspondant au champignon pathogène (*T. cucumeris* = téléomorphe de *R. solani*).

<b>Bacterial ASVs</b>					
	<b>Phylum</b>	<b>Class</b>	<b>Order</b>	<b>Family</b>	<b>Genus</b>
+	Proteobacteria	β-proteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Herminiimonas</i>
+	Proteobacteria	β -proteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Herminiimonas</i>
+	Proteobacteria	β -proteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Herminiimonas</i>
+	Proteobacteria	β -proteobacteria	Rhodocyclales	NA	NA
+	Proteobacteria	β -proteobacteria	NA	NA	NA
-	Proteobacteria	α-proteobacteria	Rhizobiales	NA	NA
-	Proteobacteria	β -proteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i>

<b>Fungal ASVs</b>					
	<b>Phylum</b>	<b>Class</b>	<b>Order</b>	<b>Family</b>	<b>Genus-Species</b>
+	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
+	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
+	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
+	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
+	Glomeromycota	Glomeromycetes	NA	NA	NA
+	Glomeromycota	Glomeromycetes	NA	NA	NA
+	Glomeromycota	Glomeromycetes	NA	NA	NA
+	Glomeromycota	Glomeromycetes	NA	NA	NA
+	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	fam Incertae sedis	<i>Acremonium curvulum</i>
-	Zygomycota	cls Incertae sedis	Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>
-	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomidium leptoderma</i>
-	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium solani</i>
-	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Lasiochaetaceae	NA
-	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys rosea</i>
-	Zygomycota	cls Incertae sedis	Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Mortierella elongata</i>



stimulant ou renforçant l'élongation raculaire, compétition plus étendue pour les ressources partagées avec le champignon pathogène, occupation plus rapide et étendue de niches cible du mycélium pathogène, antibiose et fongistase réduisant à terme l'extension et la pénétration du mycélium pathogène. Au stade d01, le champignon commence à coloniser la graine germée et à infecter les racines en formation. Les graines sc2 étant moins riches en bactéries à d01, cela en fait une communauté potentiellement moins compétitive vis-à-vis du pathogène, qui peut infecter la graine germée plus précocement pour les raisons inverses que celles évoquées précédemment pour sc0. La communauté sc2 constituée contient peut-être des souches potentiellement moins antagonistes de *R. solani* R5 que sc0 (recrutées directement du sol), ou des souches antagonistes de souches protectrices davantage recrutées dans le sol en sc0. La seule souche de la sc2 qui présentait un effet antagoniste sur le champignon (souche 4, *Frigoribacterium*) ne s'est pas maintenue sur graine ni sur plantule.

Une analyse DESeq a été effectuée afin d'identifier les taxons bactériens dont l'abondance relative est significativement modifiée en présence ou en absence du champignon pathogène (**Tableau 6**). Seulement 5 ASV bactériens ont été détectés comme enrichis en condition inoculée. Ces ASV ont tous été affiliés aux  $\beta$ -protéobactéries dont 3 appartenaient au genre *Herminiimonas*. Bien qu'il ne s'agisse pas des mêmes genres bactériens, les résultats du **chapitre III** indiquaient que de nombreuses  $\beta$ -protéobactéries appartenant notamment à l'ordre des Burkholderiales étaient également enrichies en présence du pathogène. Cela souligne une fois de plus l'importance de cette classe de taxons dans la structure du microbiote des plantes infectées par *R. solani*. En ce qui concerne les taxons fongiques, 9 étaient enrichis suite à l'inoculation de *R. solani*, dont 4 affiliés à cette espèce fongique (*Thanatephorus cucumeris*), et 4 appartenant tous à la classe des Glomeromycetes mais non affiliés à l'ordre. Par ailleurs, l'abondance relative de 6 ASV fongiques était diminuée en présence du champignon phytopathogène, probablement du fait d'une forte compétitivité vis-à-vis des ressources (**Tableau 6**).



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, l'inoculation de communautés synthétiques sur graines de colza stérilisées en surface permet de s'affranchir de la grande variabilité du microbiote des graines et d'obtenir des résultats répétables et des phénotypes plus tranchés. Notre premier objectif était de voir si des souches présentes sur graines pouvaient se maintenir dans les tissus végétaux aux premiers stades de la vie d'une plante et si leur présence influençait l'assemblage du microbiote des plantules. Grâce à leur séquence *gyrB* donnant accès à un ASV unique, il nous a été possible de retrouver nos souches à travers tout le jeu de données. Ces souches n'ayant pas été détectées dans les échantillons de sol, leur présence dans les plantules confirmait leur provenance de la graine. Malgré le fait que seulement 3 souches sur les 6 prévues se soient effectivement implantées sur graine et plantule, probablement du fait d'un déséquilibre dans les concentrations initiales de chaque souche, cette SynCom a eu un effet significatif sur la richesse bactérienne au stade graine germée et sur la structure des communautés bactériennes à tous les stades de développement, en comparaison avec la sc0 ne comportant aucune souche. Cela démontre l'importance de la composition du microbiote des graines de colza sur l'assemblage du microbiote des plantes au moins dans une phase précoce de développement.

Nous avons mis en évidence qu'une graine non (ou très peu) colonisée par son propre microbiote résiduel devient plus permissive au microbiote environnant du sol. En changeant la composition du microbiote inoculé, il est possible de recruter d'autres microorganismes du sol, ce qui correspond finalement à une sélection pilotée. Si l'on regarde la part expliquée par le génotype sur la  $\beta$ -diversité bactérienne (16,9 %) obtenue dans des conditions spéciales d'autofécondation (**Chapitre I**, Rochefort *et al.*, 2019), la part expliquée par le traitement SynCom induit ici (11,6 %) est intéressante et pourrait être améliorée par d'autres compositions de SynCom. Pour être plus proche d'une réalité agronomique, il faudrait cribler des SynCom sur des graines natives non stérilisées en surface et observer les interférences avec le microbiote résident des graines.

Notre second objectif était d'interférer sur la réponse de la plante à une maladie tellurique avec des communautés synthétiques construites à partir du microbiote de graine. *R. solani* provoquant des pourritures racinaires précoces sur jeune plante, cela en faisait un pathogène de choix pour cette étude. Nous avons mis en évidence un effet de la communauté synthétique sur la sensibilité de la plante au champignon pathogène.



On peut se poser la question de la dominance de *P. agglomerans* qui ne semble pas conférer d'avantage phénotypique à la plante (au moins à ce stade précoce) mais est transmise efficacement dans tous les habitats de la plantule. Comme cet ASV est très fréquent et abondant dans le microbiote des graines de colza et au contraire peu abondant ni recruté dans le sol, il a peut-être un rôle beaucoup plus tardif au moment de la formation et l'entrée en dormance, voire de la conservation de la graine.

La connaissance du génome des souches intégrées dans les SynCom (en cours de séquençage) permettra à terme de suivre l'expression de leurs gènes aux différents stades de transmission à partir d'inoculations de sc1 et sc2. Mais il serait plus profitable à l'avenir de travailler avec 2 SynCom ayant des effets significatifs différents sur la maladie.

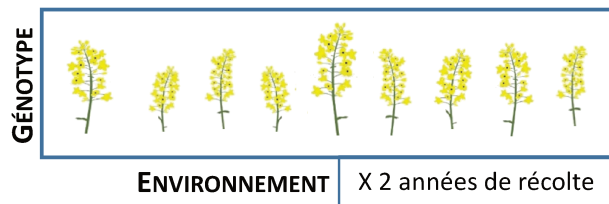


# DISCUSSION-PERSPECTIVES

---

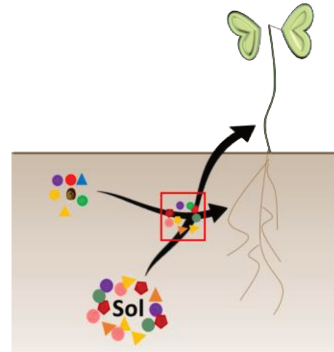
## Chapitre I

L'année de récolte et le génotype de l'hôte ont une influence relative sur la structure du microbiote des graines de colza.



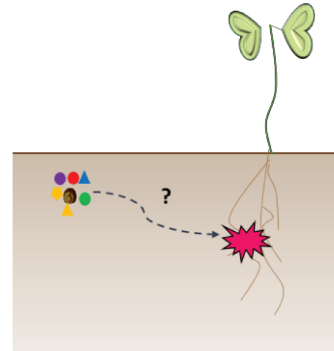
## Chapitre II

Le microbiote des graines n'influence pas la structure des communautés microbiennes des plantules. Mais il y a émergence dans les plantules de taxons rares lors de la coalescence entre le microbiote du sol et de la graine.



## Chapitre III

Le microbiote des graines module la gravité des symptômes mais pas la quantité de champignon pathogène. Un sol de diversité microbienne élevée favorise les variations de maladie et de quantité de pathogène entre génotypes et années.



## Chapitre IV

L'inoculation sur graines permet la persistance de souches bactériennes à la plantule. La diversité des souches appliquées sur graines influence la structure du microbiote des plantules et leur réponse à une maladie tellurique.

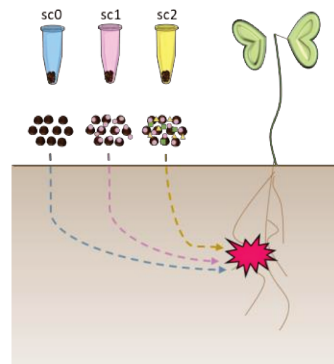


Figure 1 : Bilan des principales conclusions supportées par les différents chapitres de ce manuscrit de thèse.



## DISCUSSION GENERALE

---

### OBJECTIFS ET RESULTATS PRINCIPAUX (Fig. 1)

Mon projet de thèse visait à étudier le microbiote des graines de *B. napus* afin de comprendre son rôle dans la structuration du microbiote des plantes, et dans leur réponse au champignon phytopathogène *R. solani*. Ce champignon a été choisi car il peut infecter la plante dès la germination de la graine, et provoquer des symptômes précoces.

La première étape était de comprendre les facteurs structurant le microbiote des graines de colza. Dans le **Chapitre I**, nous avons ainsi mis en évidence que l'année de récolte et dans une moindre mesure le génotype de l'hôte étaient deux facteurs impliqués dans les changements de composition taxonomique du microbiote des graines. Ces changements de composition taxonomiques ont été corrélés à des différences de cinétique de germination. Le rôle du microbiote des graines dans la cinétique de germination reste à présent à démontrer.

Dans le **Chapitre II**, nous avons étudié la coalescence entre les communautés microbiennes de la graine et du sol afin de déterminer quelle est la source de microbiote pour les plantules et comment varie la transmission des sources sol et graine à la plantule. Nous avons testé la double hypothèse que le microbiote de la graine et la diversité du microbiote du sol influence la structuration du microbiote associé à la racine et à la tige. Nous n'avons pas montré d'influence du microbiote de la graine, la diversité de sol étant le facteur structurant les assemblages microbiens des racines et des tiges. En revanche, cette étude met en évidence la sélection de taxons rares provenant du sol et de la graine qui deviennent dominants dans les plantes. Il s'agit de la première étude portant sur les phénomènes de coalescence du microbiote chez la plante.

Dans le **Chapitre III**, nous avons étudié l'impact du microbiote de la graine sur la réponse de la plante au champignon pathogène *R. solani*. Nous avons observé une réduction de la gravité de la maladie (réduction des symptômes) en relation avec le microbiote des graines mais pas de réduction de l'abondance du pathogène. Cette ambivalence ne nous permet pas de conclure ici définitivement sur le rôle du microbiote de la graine dans l'expression de cette maladie causée par *R. solani*. De plus, le niveau de



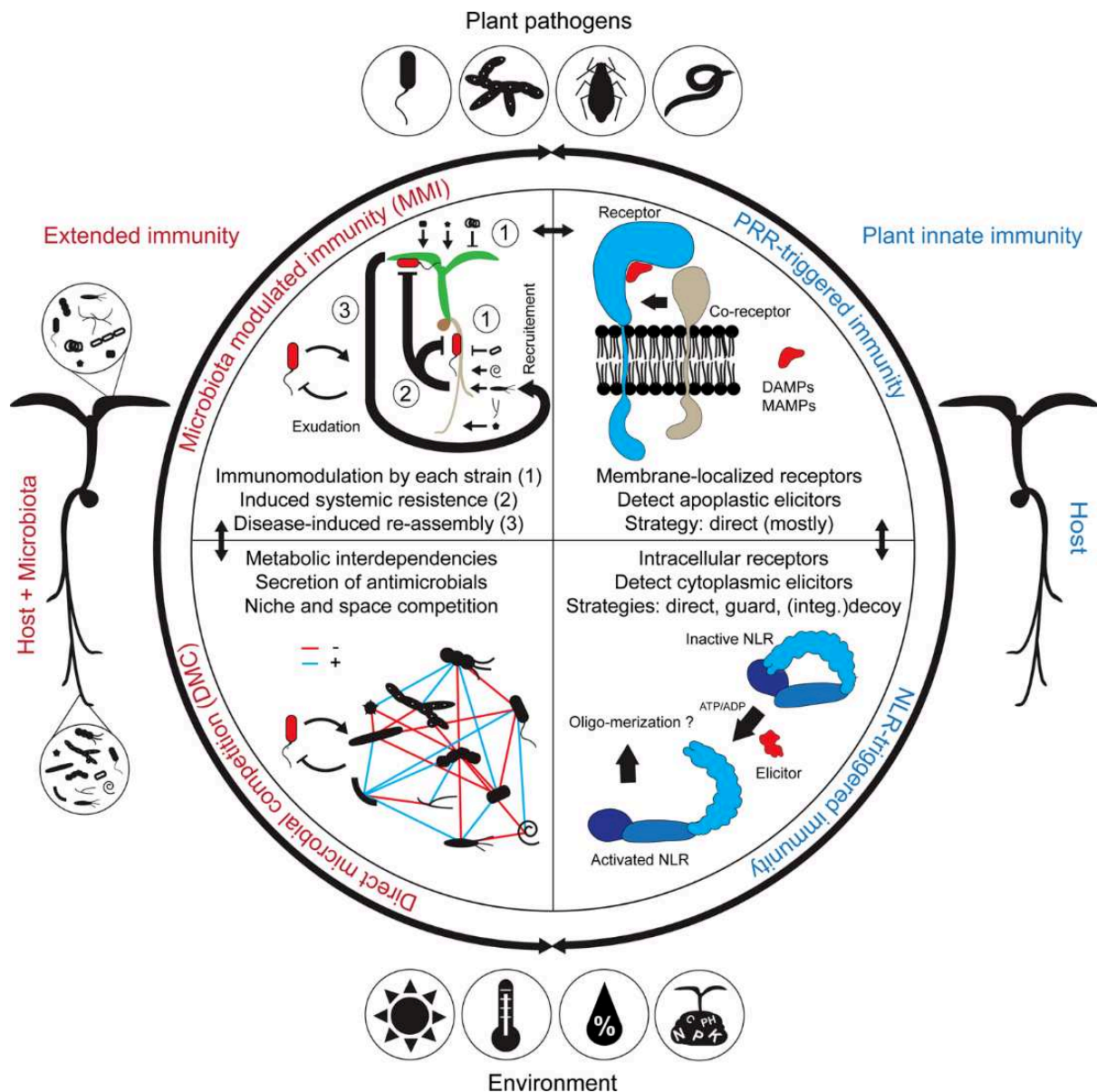
diversité du sol favorise les variations de quantité de pathogène et d'expression de maladie entre géotypes et années.

Enfin, nous avons étudié dans le **Chapitre IV** la transmission de taxons bactériens de la graine à la plante par l'usage de communautés synthétiques (SynCom) constituées à partir de bactéries isolées des graines de colza. Nous avons montré que l'inoculation sur graine permet la persistance de certains taxons dans les plantules. Par ailleurs, la diversité des SynCom sur graines influence par la suite la structure du microbiote des plantes et semble impacter la capacité d'infection du champignon pathogène *R. solani*.

### **INFLUENCE DU GENOTYPE DE L'HOTE SUR LA STRUCTURATION DU MICROBIOTE**

Dans le Chapitre I, nous avons étudié l'influence relative de l'environnement et du géotype de l'hôte sur la structure du microbiote des graines de colza. Afin de travailler avec des lignées génétiques pures, nous avons caractérisé la structure du microbiote de lots de graines obtenues en autofécondation. Grâce à ce dispositif nous avons mis en évidence une forte influence de l'année de récolte mais également du géotype de l'hôte sur la structure des communautés microbiennes des graines. L'année de récolte reste le principal facteur influençant la structure des communautés fongiques des graines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Klaedtke *et al.* (2016) où les communautés fongiques des graines de haricot sont principalement influencées par les pratiques culturales et la localisation géographique. L'impact du géotype sur la structure du microbiote endophyte des graines de colza avait déjà été investigué, mais les lots de graines provenaient de différentes localisations géographiques ce qui ne permettait pas de séparer l'effet géotype de l'effet environnement (Rybakova *et al.*, 2017). En règle générale, l'effet du géotype sur la structure du microbiote des plantes est faible quel que soit le compartiment étudié (Bouffaud *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012; Horton *et al.*, 2014; Pérez-Jaramillo *et al.*, 2017).

Nos résultats montrent qu'il existe une héritabilité des taxons de la graine en fonction du géotype, mais de niveau faible comme c'est le cas pour les compartiments rhizosphériques et phyllosphériques (Wallace *et al.*, 2018; Walters *et al.*, 2018; Thiergart *et al.*, 2020). Nous n'avons pas établi de corrélation entre la distance génétique des graines et leur composition microbienne. D'autres études avant la nôtre ont cherché à établir ce



**Figure 2 : Immunité étendue de l'hôte médiée par le microbiote.** Les récepteurs extracellulaires (PRR) reconnaissent les signaux moléculaires associés aux microorganismes (MAMP) et à leurs dommages (DAMP) au niveau de la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule, les récepteurs intracellulaires (NLR) reconnaissent les effecteurs des agents pathogènes, directement ou indirectement via les protéines de l'hôte ciblées par ces effecteurs. Ce système immunitaire inné est modulé par le microbiote (MMI), qui induit une résistance systémique et renforce la résistance des plantes aux agents pathogènes. Le microbiote végétal fournit une activité protectrice contre les agents pathogènes par compétition microbienne directe (DMC). La DMC comprend la compétition pour les nutriments et l'espace ainsi que la sécrétion de composés antimicrobiens, et ces interactions sont intégrées dans un réseau complexe qui dicte la croissance des agents pathogènes dans les plantes. ADP = adénosine diphosphate ; ATP = adénosine triphosphate ; NLR = domaine de liaison aux nucléotides et récepteur contenant des répétitions riches en leucine ; MMI = immunité médiée par le microbiote ; PRR, récepteur de reconnaissance des signaux moléculaires.

Vannier *et al.*, 2019.

lien pour d'autres habitats de la plante, en vain (Bouffaud *et al.*, 2012; Schlaeppi *et al.*, 2014). Pourtant, chez le riz et d'autres espèces de la famille des Poacées, des corrélations ont été montrées entre la distance génétique de lignées, génotypes, ou variétés intra-espèces et la diversification du microbiote (Bouffaud *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020). En fait, ces études comparent surtout des variétés anciennes cultivées depuis des milliers d'années, avec des variétés modernes, ou encore des lignées sauvages et domestiquées qui ont beaucoup divergé génétiquement, et qui présentent des patrons de sélection différents de leur microbiote (Mazel *et al.*, 2018). A l'inverse, dans notre étude, les génotypes de colza sélectionnés restent relativement proches génétiquement, bien qu'ils appartiennent à des groupes génétiques différents. Pour vraiment comprendre s'il y a ou non une corrélation entre génotype et microbiote chez la graine de colza d'hiver, il serait intéressant de refaire cette étude avec un nombre beaucoup plus important de génotypes couvrant une plus grande diversité génétique (Rochefort *et al.*, 2019). En effet, on sait que certains traits de la plante comme des gènes du système immunitaire ont un impact sur la structuration du microbiote des plantes (Horton *et al.*, 2014, Bulgarelli *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2018). Ainsi, comparer des génotypes plus diversifiés génétiquement et cultivés dans différents environnements garantirait peut-être plus de patrons de diversité microbienne associée (Thiergart *et al.*, 2020).

De plus, l'effet génotype dépend de l'environnement, car dans notre cas, d'une année à l'autre l'influence du génotype n'était pas la même. Il est donc important de toujours tenir compte de l'interaction génotype\*environnement pour tirer des conclusions sur l'héritabilité d'un microbiote (Opstal & Bordenstein, 2015). Dans notre étude, un des objectifs d'estimer l'effet du génotype de colza sur la structure du microbiote des graines était de pouvoir sélectionner ensuite des génotypes aux microbiotes contrastés pour comprendre l'influence du microbiote des graines sur la structuration du microbiote de la plante et sur ses phénotypes. A plus long terme l'idée serait de sélectionner des génotypes présentant naturellement des microbiotes favorisant la santé et la croissance de la plante. En effet, le microbiote est aujourd'hui considéré comme impliqué dans l'immunité étendue de l'hôte, pour sa capacité *(i)* à moduler ou induire le système immunitaire intrinsèque de la plante et *(ii)* à apporter en externe ou en proximité intime avec la plante un système de défense supplémentaire agissant directement sur les agents pathogènes (**Fig. 2**). Ces deux composantes de l'immunité étendue ne sont pas disjointes et reposent sur des échanges de signaux et de métabolites entre le microbiote



et la plante (Hacquard *et al.*, 2017; Vannier *et al.*, 2019). D'après Darrasse *et al.* (2010), le système immunitaire de la plante n'est pas effectif ou du moins différent au moment de la germination et la levée (au moins chez le haricot). Ainsi, il semblerait que dans le cas d'une maladie précoce comme une fonte de semis ou nécrose due à *R. solani*, ce soit davantage la part externe de l'immunité étendue, donc l'activité directe du microbiote sur le parasite qui participe à la protection de la plante. Pour valider cette hypothèse, il est important de bien caractériser le système immunitaire du colza de la germination à la levée.

Cependant, la part d'héritabilité étant faible, on peut se demander si on peut efficacement piloter les associations bénéfiques via le génotype de la plante et s'il n'est pas nécessaire de progresser encore sur la compréhension de l'influence de l'environnement biotique et abiotique externe à la plante afin de définir des leviers modelant l'interaction microbiote-plante (par exemple par inoculation microbienne, modification de l'environnement physicochimique, ou des pratiques culturales). Il convient donc de tenir compte cette fois-ci de l'interaction génotype-microbiote\*environnement, en considérant non pas seulement la génétique de l'hôte mais l'holobionte entier selon l'environnement dans lequel il évolue (Vandenkoornhuysse *et al.*, 2015).

## TRANSMISSION DU MICROBIOTE DES GRAINES

Pour tester les hypothèses des chapitres II et III, nous avons pris avantage de la variation naturelle de la diversité du microbiote des graines et du contraste dans la composition du microbiote des graines de quelques génotypes de colza. Ainsi, nous avons testé si des graines issues de lots de semences avec des compositions microbiennes différentes induisent des différences de structure du microbiote des plantules ainsi que des différences de réponse de la plante à une maladie tellurique précoce. Nous n'avons pas montré d'effet du génotype ni du microbiote des graines sur la transmission du microbiote aux plantules (chapitre II). En revanche, nous avons observé une influence du microbiote de la graine sur la réponse de la plante à la maladie, mais pas sur la quantité de champignon pathogène (chapitre III). Dans ces deux chapitres, nous avons fait le choix de travailler dans un sol vivant (soit une matrice sol colonisée par un microbiote issu de sol) car il s'agit du premier habitat (ou environnement) que rencontre la graine en germination et cela permet de comprendre le rôle du réservoir de diversité microbienne





du sol dans l'assemblage du microbiote de la plantule. En effet, des études antérieures ont exploré les processus impliqués dans la transmission du microbiote de la graine à la plantule, en conditions axéniques ou dans une matrice de sable stérile (Barret *et al.*, 2015, Torres-Cortés *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2020). Cette méthode a permis de montrer l'implication de la graine en tant que source d'inoculum primaire pour la plantule. Ici, utiliser une autre source de diversité microbienne (le sol) nous a permis d'estimer l'impact relatif du microbiote du sol sur l'assemblage des communautés microbiennes des racines et des tiges. Nous avons aussi introduit un différentiel de diversité de sol, et avec la variabilité de la diversité microbienne de la graine, nous avons de manière originale décrit l'impact d'événements de coalescence sur l'assemblage du microbiote de la plantule. Si nous avons bien révélé l'influence de la diversité du sol, aucun effet de la variabilité du microbiote des graines n'a été observé. Nous supposons que la variabilité entre microbiote de chaque graine d'un même lot génotype\*année était trop élevée pour valider cet impact. Mais notre travail reflète la présence d'une communauté microbienne globale du lot de graine utilisé.

En revanche nous avons mis en évidence que des taxons provenant de la graine étaient effectivement retrouvés dans les racines et les tiges. Cependant, aucun taxon du core-microbiote des graines de colza (identifié dans le chapitre I) n'a été détecté dans les racines et les tiges. Pourtant, dans le chapitre I, nous avons montré que certains taxons généralement abondants sur graines sont partagés entre tous les génotypes de colza et même entre plusieurs espèces végétales de la famille des Brassicacées (Rochefort *et al.*, 2019). Si ces taxons sont effectivement très fréquents, abondants et retrouvés sur plusieurs générations de graines de colza, mais également chez plusieurs espèces végétales, produites sur plusieurs sites, il est probable qu'ils ne soient pas transmis par le sol. Le fait de ne pas les retrouver dans les racines ou les tiges suggère plusieurs possibilités : soit ils sont associés à des compartiments non-échantillonnés dans notre étude (*e.g.* feuilles, méristème apical...), soit ils sont perdus et seront apportés de nouveau horizontalement par une source extérieure.

De manière intéressante, qu'ils proviennent du sol ou de la graine, l'abondance relative de la plupart des taxons bactériens transmis augmente dans les plantules lorsqu'ils étaient rares dans le réservoir de départ. De nombreuses études ont mis en avant l'importance des taxons rares dans la structure des communautés microbiennes,

**Tableau 1 : Vue d'ensemble de questions de recherches et approches utilisées dans l'étude des taxons rares (Jousset et al., 2017).**

	<i>Research questions</i>	<i>Method</i>	<i>Critical issues</i>	<i>Options</i>	<i>References</i>
<i>Synthetic communities</i>					
	Order of arrival	Vary order of arrival to test priority effects	Cultivation dependent	Selective/spatially structured media	Fukami and Morin, 2003
	Density-dependent effects	Vary abundances to test effects of rare species	Cultivation dependent	Cell separation via microfluidic or flow cytometry	Zhang et al., 2009
<i>Manipulation of natural communities</i>					
Removal	Consequence of rare species loss	Dilution-to-extinction	Equal biomass in all treatments	Incubation period for recovery of biomass	Philippot et al., 2013; Mallon et al., 2015; Hol et al., 2015a,2015b; Delgado-Baquerizo et al., 2016
Enrichment	Responders to changing conditions	Salinity, dry-rewet, predation, pollution, nutrient amendments	Molecular methods for composition (DNA) and activity (RNA)	DNA normalization; improve coverage rare biosphere via single-cell genomics	Giebler et al., 2013; Aanderud et al., 2015
<i>In situ</i>					
	Microbial population dynamics	Time series	Availability of data sets	Increase sampling	Shade et al., 2014
	Genome recovery of rare species; predict metabolic pathways	Single-cell genomics	Selection of target	Labeling via FISH	Podar et al., 2007; Freilich et al., 2011
	Function of rare species	SIP; Nano-SIMS	Low throughput	Combine with single-cell analysis	Musat et al., 2008; Pester et al., 2010

Abbreviations: FISH, fluorescence *in situ* hybridization; SIMS, secondary ion mass spectrometry; SIP, stable isotope probing.

dans les processus biogéochimiques ou encore dans la stimulation de l'immunité de l'hôte (**Tableau 1**) (Lynch & Neufeld, 2015; Jousset *et al.*, 2017; Banerjee *et al.*, 2018). Ainsi, les taxons rares de la rhizosphère constituent une importante fraction de la diversité bactérienne dans cet habitat (Dohrmann *et al.*, 2013), de même que les rares ne participent pas de la même manière que les abondants à la dynamique des communautés microbiennes des racines (Li *et al.*, 2018) et de nombreux autres écosystèmes (Shade *et al.*, 2014). D'autre part, le recrutement et l'émergence de taxons rares de la rhizosphère dans les racines a été montré chez le tabac (Saleem *et al.*, 2016), de même que la coalescence des communautés lors de la rencontre entre eau douce et eau salée favorise l'émergence de taxons rares (Rocca *et al.*, 2020).

On peut se demander quels sont les processus écologiques impliqués dans la transmission de ces taxons rares à la plantule. Si les taxons sont initialement rares, ils ont plus de chances de s'éteindre naturellement dans la communauté (dérive écologique) et il est peu probable qu'ils soient transmis de manière passive par dispersion. La transmission à la plantule de ces taxons n'est donc probablement pas liée à des processus neutres, mais plutôt médiée par de la sélection (Cordovez *et al.*, 2019). Les déterminants génétiques impliqués dans la sélection de ces taxons rares restent cependant à identifier. Cela nécessite de pouvoir cultiver les rares pour connaître leur génome, leur physiologie et leurs interactions potentielles avec les taxons dominants. Il se peut également que ces taxons soient rares à l'échelle du lot de graine mais plus abondants à l'échelle individuelle. Cette variabilité du microbiote entre chaque graine est une composante difficile à appréhender sans destruction de la graine, ou nécessite un échantillonnage encore plus grand du nombre de graines dans les expérimentations. Pour le sol, l'échantillonnage peut être également augmenté pour mieux incorporer les rares dans l'analyse de diversité. Mais dans un sol tamisé et remanié, l'hétérogénéité est plus faible que dans une parcelle au champ et les différences de diversité sont davantage au niveau de l'agrégat de sol.

Les résultats obtenus à l'issue du chapitre II soulignent bien l'importance de ne pas sous-estimer les rares dans les communautés microbiennes, puisqu'une partie d'entre eux est transmise du sol ou de la graine à la plantule et y devient plus abondante. Cultiver la diversité microbienne d'un échantillon environnemental favorise la détection de taxons rares non détectés par les techniques moléculaires (Lynch & Neufeld, 2015). D'ailleurs dans le chapitre IV, la culturomique nous a permis d'isoler des taxons non détectés par



métabarcoding, s'agissant potentiellement de taxons rares du microbiote des graines de colza. Pour favoriser l'obtention de ces rares du sol et de la graine, il faudrait également les cultiver à partir de la plantule.

## ÉTUDE DU MICROBIOTE : LIMITES ET PERSPECTIVES

Tout au long de cette thèse, l'analyse du microbiote des graines, du sol et des plantules a principalement été réalisée par métabarcoding en ciblant une portion d'un gène permettant d'estimer la composition taxonomique de ces communautés. Bien que cette méthode permette d'appréhender la richesse, la diversité et la structure du microbiote, et d'observer son implication dans des phénotypes de l'hôte, elle présente également des limites.

### Peut-on estimer l'abondance absolue du microbiote ?

Par métabarcoding, l'abondance de chaque taxon ne peut être quantifiée de manière absolue et seule une estimation de l'abondance relative est possible par comptage du nombre de copies du marqueur moléculaire amplifié. Plusieurs biais sont alors induits : l'amplification par PCR ne garantit pas une équivalence parfaite entre le nombre de copies initial et le nombre de fois ou le marqueur est amplifié, la dégénérescence de certains couples d'amorces (notamment pour *gyrB*) réduit la quantité de chaque version d'amorces et biaise un peu plus l'abondance relative, et enfin certains marqueurs sont multi-copies sur le génome (16S, 18S, ITS1) induisant obligatoirement une surestimation de l'abondance des taxons (Tabrett & Horton, 2020).

Une technique très récente, la hamPCR (Host-Associated Microbe PCR), permet de quantifier la charge totale microbienne en calculant un ratio de quantité d'ADN du microbiote sur la quantité d'ADN de l'hôte (Lundberg *et al.*, 2020). Cela reste du métabarcoding mais cette fois, deux couples d'amorces sont utilisés (multiplex) : un couple d'amorces ciblant un gène de l'hôte (plante ou autre), et un couple d'amorces bactérien ou fongique. Cette technique permet certes de quantifier la charge microbienne par rapport à une quantité d'ADN de l'hôte, mais le caractère absolu de la réponse dépendra une fois de plus du marqueur microbien amplifié. Dans cette étude, Lundberg *et al.*, proposent par exemple l'utilisation du marqueur moléculaire 16S, dont on sait pourtant que son nombre de copies par cellule varie d'un taxon bactérien à l'autre



(Větrovský & Baldrian, 2013). Par ailleurs, l'utilisation de la ham-PCR sur un échantillon très riche en microbiote risque de biaiser le ratio microbiote/hôte si la quantité d'ADN de plantes est trop faible par rapport à la charge microbienne (Lundberg *et al.*, 2020).

Par PCR quantitative, il est possible de quantifier l'abondance d'un taxon ciblé dans la communauté, c'est ce que nous avons fait avec le champignon pathogène *R. solani*. Cela nous a permis de comparer l'abondance relative obtenue en métabarcoding avec la quantité réelle de champignon mesurée dans chaque échantillon. Nous avons montré que malgré des profils relativement proches, l'abondance relative donne une information différente de celle obtenue en qPCR. La qPCR est considérée comme la méthode la plus fiable pour obtenir une valeur de quantité absolue. Mais si l'on veut quantifier plusieurs taxons, cela nécessite d'avoir pour chacun un couple d'amorces spécifiques, ce qui limite cette approche. D'autres techniques culture-dépendantes par dilution-extinction permettent également d'appréhender l'abondance de la part cultivable, mais ces techniques sont très chronophages et les milieux de culture ne permettent pas de collecter l'ensemble de la diversité microbienne.

En conclusion, à ce jour il n'existe pas encore de technique qui permette de connaître réellement et avec précision l'abondance absolue de chaque taxon constituant un microbiote. Pour manipuler le microbiote, notamment dans les approches utilisant les communautés synthétiques, il est ainsi inévitable d'établir des seuils arbitraires de concentration basés sur la connaissance de l'abondance relative des taxons dans la communauté naturelle.

### **Etude du microbiote des plantes : vers une approche fonctionnelle ?**

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le microbiote des graines dans le but de comprendre son influence sur la germination ou sur la réponse de la plante à l'attaque d'un champignon pathogène. Connaître le microbiote et montrer son implication dans des phénotypes de la plante est une manière d'appréhender ses fonctions. En effet, si le microbiote a un effet avéré sur un phénotype de la plante, cela sous-entend que certaines fonctions du microbiote sont liées à ce phénotype de l'hôte. Cependant il est important de dépasser les approches corrélatives et de s'intéresser précisément aux fonctions du microbiote des graines impliquées dans le phénotype observé, pour établir des liens puissants entre microbiote et réponse de la plante (Etalo *et al.*, 2018). La meilleure manière d'établir ces liens est en réalité d'utiliser plusieurs méthodes

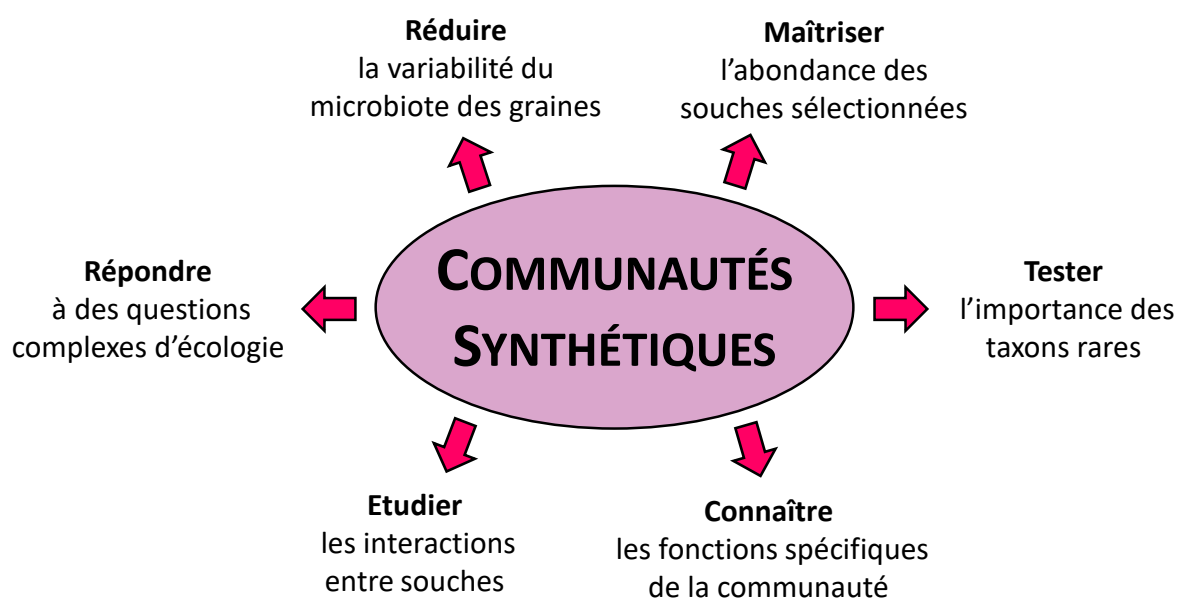




complémentaires pour savoir (i) qui est présent ? (ii) qui est associé à qui dans la communauté ? (iii) quelles sont les catégories fonctionnelles de la communauté ? (iv) qui assure quelle fonction ?

Par métabarcoding, il est possible de prédire les catégories fonctionnelles principales d'une communauté microbienne avec des outils comme PICRUSt ou Tax4Fun (Langille *et al.*, 2013; Aßhauer *et al.*, 2015). Mais cette approche ne permet pas d'appréhender des fonctions et des familles de gènes spécifiques d'une communauté, qui la différencierait vraiment des autres communautés. Le séquençage aléatoire de fragments d'ADN (shotgun) et autres technologies de séquençage longs fragments (PacBio, Nanopore) permettent de couvrir de plus larges régions génomiques, voire d'assembler des génomes entiers et donc de prédire plus précisément certaines fonctions sans nécessiter d'inférence taxonomique systématique (Sedlazeck *et al.*, 2018; Fadiji & Babalola, 2020; Moss *et al.*, 2020). Cependant, quelle que soit la méthode sus-citée, il reste difficile d'établir un lien entre ces catégories fonctionnelles et les phénotypes observés, et donc de définir les mécanismes de la communauté impliqués dans la fitness de son hôte. Mais il n'y a pas de lien entre l'abondance d'un taxon dans la communauté et sa prévalence fonctionnelle (Hinsu *et al.*, 2020). C'est pourquoi la prédiction de fonctions d'une communauté microbienne basée uniquement sur le séquençage (métabarcoding ou métagénomique) ne suffit pas à comprendre l'activité fonctionnelle d'un microbiote. La méthode qui reste la plus résolutive et qui serait mieux reliée à l'activité du microbiote à un moment donné, serait la métatranscriptomique (Shakya *et al.*, 2019; Tabrett & Horton, 2020). Cette technique donne accès directement aux transcrits des gènes, exprimés dans un contexte précis, dévoilant donc les voies de signalisation activées et les fonctions des taxons les plus actifs dans la communauté (Jiang *et al.*, 2016; Bashiardes *et al.*, 2016). Cependant, là encore, il est impossible d'associer une fonction à un taxon spécifique de la communauté. Ainsi, même une fois que l'on a accès à la composition taxonomique et fonctionnelle du microbiote, comment savoir quelles fonctions sont associées à quels taxons, et lesquels on peut effectivement manipuler (Widder *et al.*, 2016; Fadiji & Babalola, 2020) ?

Par ailleurs, lors de l'annotation des génomes, certains gènes sont définis dans les bases de données comme ayant des fonctions putatives, dont l'expression n'a jamais été étudiée spécifiquement pour déterminer leur véritable fonction (Berg *et al.*, 2020). Bien



**Figure 3 : Utilisation de communautés synthétiques, avantages pour identifier des leviers de pilotage du microbiote des plantes.**

**Tableau 2 : Exemples d'utilisation des communautés synthétiques et réponse obtenue (Compant et al., 2019).**

Plant and growth conditions	Consortia/origin of bacteria	Stress	Consortia effect
<i>Arabidopsis thaliana</i> , growth chamber, non-sterile soil	<i>Xanthomonas</i> sp. WCS2014-23, <i>Stenotrophomonas</i> sp. WCS2014-113, <i>Microbacterium</i> sp. WCS2014-259/ field soil with endemic <i>Arabidopsis</i> plants	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	Less fungal spores and higher plant fresh weight
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker, growth chamber	<i>Bacillus megaterium</i> SOGA_2, <i>Curtobacterium ceanosedimentum</i> SOGA_3, <i>Curtobacterium</i> sp. SOGA_6, <i>Massilia aurea</i> SOGA_7, <i>Pseudomonas coleopterorum</i> SOGA_5, 11 and 12, <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> SOGA_13, <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> SOGA_14 and 19, <i>Frigoribacterium faeni</i> SOGA_17, <i>Xanthomonas campestris</i> SOGA_20/phylosphere of field-grown tomato plants	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Fewer pathogen DNA copies on leaf disks
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Lady Clair, cv. Victoria, cv. Bintje, leaf disks in petri dishes	Double or triple combinations of <i>Pseudomonas</i> spp. R32, R47, R76, R84, S04, S19, S34, S35, S49/rhizosphere and phyllosphere of field-grown potatoes	<i>Phytophthora infestans</i>	Reduced fungal sporangiophore development
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Jiangshu, greenhouse pots with soil	<i>Pseudomonas</i> spp. CHA0, PF5, Q2-87, Q8R1-96, 1M1-96, MVP1-4, F113, Phl1C2/pea, wheat, cotton, tomato, sugar beet, tobacco	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Reduced disease severity and pathogen abundance
Blue maize CAP15-1 TLAX/greenhouse pots with vermiculite	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440, <i>Sphingomonas</i> sp. OF178, <i>Azospirillum brasiliense</i> Sp7, <i>Acinetobacter</i> sp. EMM02/unknown	Dessica-tion	Increase of shoot and root dry weight, plant height and plant diameter
<i>Capsicum annuum</i> , <i>Vitis vinifera</i> cv. Barbera, growth chamber, greenhouse	<i>Acinetobacter</i> sp. S2 and <i>Bacillus</i> sp. S4, <i>Sphingobacterium</i> sp. S6, <i>Enterobacter</i> sp. S7 and <i>Delftia</i> sp. S8/ <i>Vitis vinifera</i> rhizosphere and endosphere	Drought	Increased fresh root, aerial biomass and photosynthesis
<i>Nicotiana attenuate</i> , field	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> E46, <i>Bacillus mojavensis</i> K1, <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> A176, <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> E46, <i>Bacillus cereus</i> CN2, <i>Bacillus megaterium</i> B55, <i>Bacillus mojavensis</i> K1, <i>Pseudomonas azotoformans</i> A70, <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> A176, <i>Bacillus megaterium</i> B55, <i>Pseudomonas azotoformans</i> A70/tobacco plants	Natural wilt disease	Less dead plants

qu’annotés, les génomes microbiens contiennent encore beaucoup de gènes aux fonctions putatives ou inconnues. Il est nécessaire de continuer à élucider la fonction des gènes par des approches ciblées (Heintz-Buschart & Wilmes, 2018). C’est pour cela qu’il faut aller vers des approches simplifiées en constituant des communautés synthétiques à partir de microbiotes déjà décrits, facilitant ainsi la description précise de nouvelles fonctions associées à un phénotype décrit dans une situation donnée.

### **L’UTILISATION DE COMMUNAUTES SYNTHETIQUES : UNE APPROCHE PROMETTEUSE POUR PALIER A LA VARIABILITE DU MICROBIOTE DES GRAINES (Fig. 3)**

Dans le chapitre IV, nous avons, pour la première fois, constitué des communautés synthétiques (SynCom) à partir d’isolats de graines que nous avons ensuite réimplanté sur graines. En effet, à notre connaissance, la totalité des études ayant utilisé cette approche, ont constitué des SynCom avec des isolats de feuilles (Bodenhausen *et al.*, 2014; Carlström *et al.*, 2019), racines (Niu *et al.*, 2017; Herrera Paredes *et al.*, 2018; de Souza *et al.*, 2019) ou même du sol, même si leur objectif était parfois d’inoculer la graine avec ces SynCom (Bai *et al.*, 2015). Le plus souvent, les isolats étaient choisis pour suivre leur localisation sur/dans les tissus de la plante (Bai *et al.*, 2015), pour tester des effets de priorité (Carlström *et al.*, 2019) ou pour leur capacité à promouvoir la croissance ou la santé de la plante. Ainsi, plusieurs questions de recherche ont été explorées grâce à l’utilisation de SynCom (**Tableau 2**, Compant *et al.*, 2019). Cependant rares sont les études ayant effectué leurs expérimentations dans un sol vivant. Dans notre cas, il y avait un grand intérêt à travailler avec des SynCom constituées de bactéries isolées de la graine, pour garantir leur maintien sur graines car une fois dans un sol vivant, si les bactéries sélectionnées n’avaient pas été adaptées à l’habitat graine, comment pouvions-nous favoriser leur maintien et leur transmission à la plantule ?

Dans notre étude l’objectif était de montrer la transmission et l’implication du microbiote de la graine sur la structure du microbiote des plantules et leur réponse à une maladie tellurique. Comme nous n’étions pas parvenu à établir de lien direct dans les chapitres II et III, nous avons émis l’hypothèse qu’en réduisant la complexité des assemblages, et donc la variabilité, l’influence du microbiote de la graine serait plus tranchée. C’est en effet ce que nous sommes parvenus à faire puisque des différences de structure du microbiote des plantules ont été observées en fonction du traitement

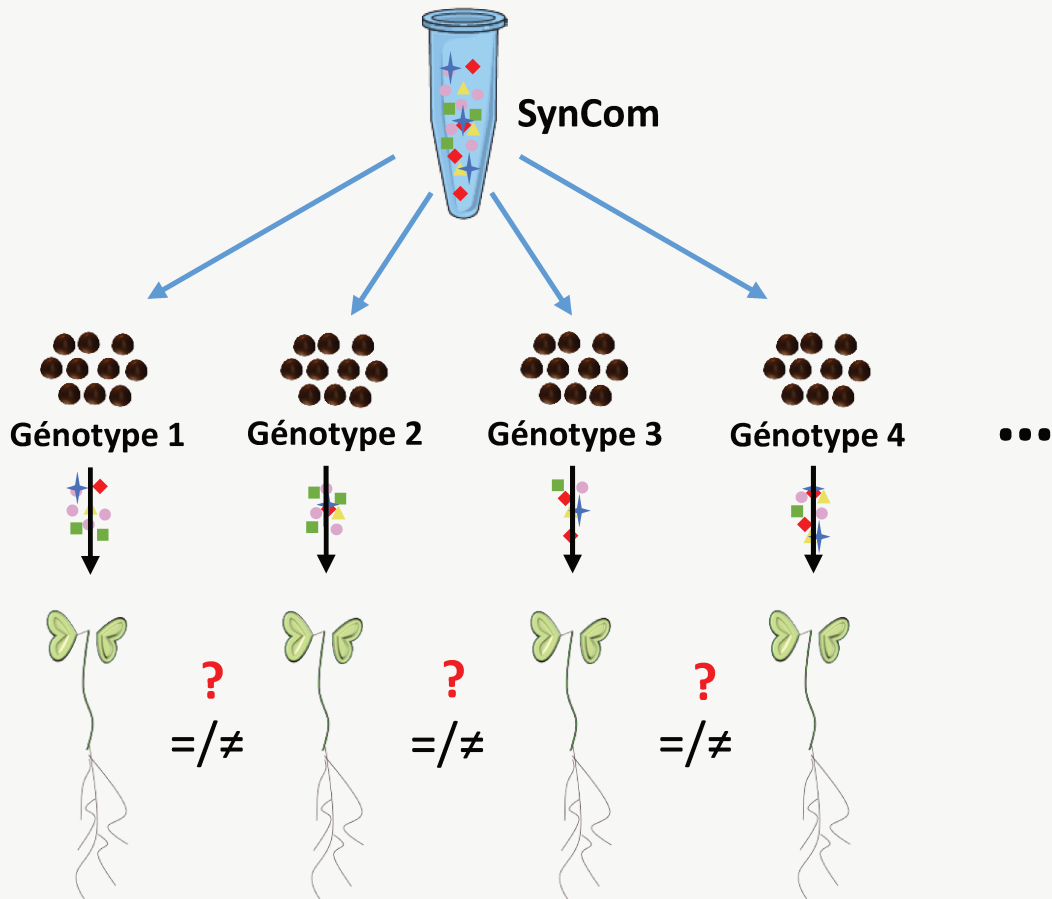


SynCom et la réponse de la plante à la maladie provoquée par *R. solani*R5 était différente en fonction de la diversité de la SynCom maintenue sur plantule. L'utilisation de SynCom sur graines est donc une approche très prometteuse pour appréhender des questions d'écologie complexes, même dans un sol vivant de diversité connue, et maîtriser la variabilité inhérente au microbiote des graines.

L'inoculation de SynCom sur graines est très intéressante car on peut plus facilement maîtriser la charge bactérienne initiale déposée. Ainsi, bien qu'il soit difficile de connaître la réelle concentration il est tout de même possible de calibrer la charge de chaque isolat dans une SynCom. En effet, la charge initiale est très importante pour le maintien des isolats de la SynCom, car en fonction du ratio entre deux souches, leur activité métabolique et leur comportement vis-à-vis d'une autre souche va changer (Gao *et al.*, 2020). Il faut donc maîtriser toutes les facettes de ces interactions pour obtenir la dynamique nécessaire afin de répondre à la question posée. Tout cela requiert donc de nombreuses études préliminaires sur les isolats que l'on souhaite ajouter dans des SynCom, afin de déterminer leurs capacités métaboliques (Omnilog, Biolog), leur succès de colonisation dans un système donné (de Souza *et al.*, 2019), les redondances fonctionnelles, leur comportement les uns vis-à-vis des autres (Helfrich *et al.*, 2018) en établissant des réseaux de cooccurrence par exemple (Toju *et al.*, 2020), ou encore leur intérêt pour répondre à la question posée. Des outils pour l'aide à la constitution haut débit de multiples SynCom sont en plein développement (kChip Microdroplets, Kehe *et al.*, 2019).

Par ailleurs, la difficulté dans la constitution de SynCom réside dans notre capacité à cultiver les taxons qui nous intéressent. Afin de connaître les milieux et conditions de culture de taxons d'intérêt, il existe une base de données répertoriant plus de 1500 milieux de culture décrits pour l'isolation de plus de 24 000 souches bactériennes et 2500 souches fongiques (<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/>). Sur cette base, un outil appelé GROWREC a été développé pour sa capacité à prédire à partir de la séquence 16S des taxons bactériens ou de leur identifiant NCBI, les milieux et les conditions adéquates pour les cultiver (<http://komodo.modelseed.org/>) (Oberhardt *et al.*, 2015). Une fois les conditions de culture maîtrisées, une étude morphologique ne suffit pas, et il faudra systématiquement typer l'isolat par barcoding pour valider sa nature taxonomique.

L'IMPLANTATION DE COMMUNAUTÉS MICROBIENNES  
SPÉCIFIQUES SUR GRAINES ET LEUR MAINTIEN SUR  
PLANTULES DÉPENDENT-ILS DU GÉNOTYPE DE L'HÔTE ?



**Figure 4 : Stratégie expérimentale proposée pour étudier l'effet du génotype de l'hôte sur le maintien de SynCom.** Ici, prenons l'exemple de lots de graines de colza de 4 génotypes différents (ou plus). Après stérilisation des graines en surface, appliquer la même communauté synthétique sur chaque lot de graines. Tous les génotypes sont-ils colonisés de la même manière sur graine (abondance, diversité, capacité de prolifération) ? La capacité de transmission de la SynCom aux plantules est-elle identique entre génotypes ?

## PERSPECTIVES

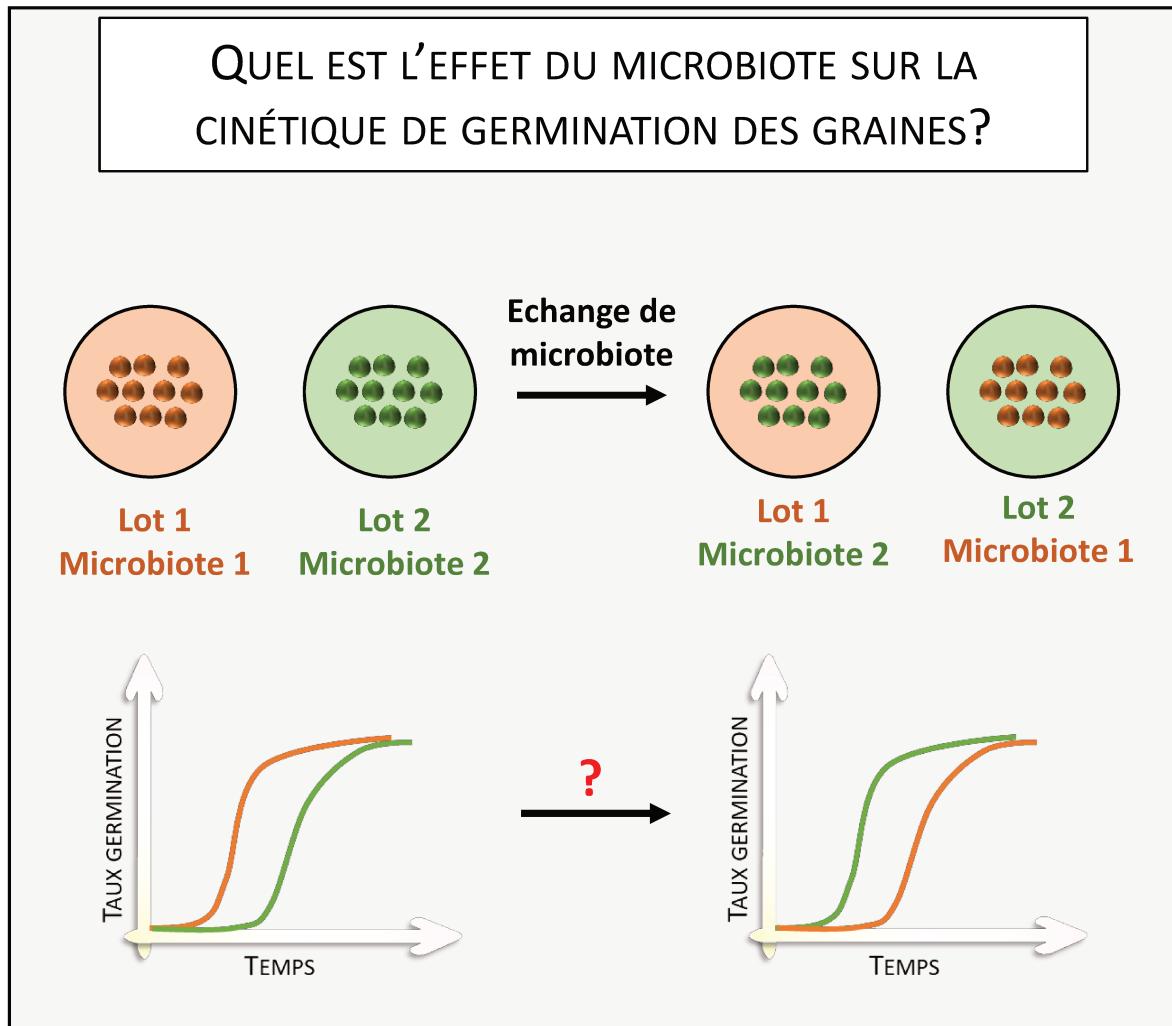
---

### **Quel est l'effet du génotype sur le maintien de communautés synthétiques ?**

Concernant maintenant la question de l'effet génotype, dans le chapitre IV nous n'avons utilisé qu'un seul génotype de graines récoltées sur une seule année. Cependant, une question très intéressante serait : est-ce que l'implantation de microorganismes sur graines dépend du génotype de l'hôte ? Pour y répondre, il faudrait travailler avec plusieurs génotypes et coloniser leurs graines avec les mêmes SynCom (**Fig. 4**). L'hypothèse serait que les SynCom se comporteraient différemment (maintien, abondance, prolifération, fonctions) en fonction du génotype et donc que certains génotypes seraient plus réceptifs que d'autres à certains taxons. Si tel est le cas, cela prouverait l'impact du génotype de l'hôte sur la dynamique du microbiote des graines et constituerait une première étape pour la sélection de génotypes de plante « réceptifs ».

### **Comment prendre en compte les taxons rares ?**

Comme il l'a été discuté précédemment, l'importance des rares dans la dynamique des communautés microbiennes ne doit pas être négligée. Ici, nous avons sélectionné des isolats qui étaient retrouvés en abondance plutôt élevée dans le microbiote des graines de colza, mais il serait intéressant d'ajouter des taxons rares dans ces SynCom, et de voir si leur abondance relative peut augmenter une fois transmis aux plantules, comme ce fut le cas dans le chapitre II. Les taxons rares identifiés dans ce chapitre II seraient de bons candidats pour explorer ces questions, mais il faudrait au préalable les retrouver en culturomique. Cependant, vu les résultats obtenus dans le chapitre IV, il est peu probable que nous réussissions à faire se maintenir des taxons rares si leur concentration initiale est inférieure à celle d'autres isolats de la SynCom, à moins que ces taxons soient effectivement sélectionnés activement par la plantule, comme nous l'avons discuté précédemment. En effet, un taxon qui est initialement rare dans une communauté peut être sélectionné et devenir plus abondant, s'il joue un rôle clé dans la communauté (Aglar *et al.*, 2016). Ces taxons seraient alors considérés comme des microorganismes « latents », attendant que la graine germe pour être sélectionnés et se développer dans la plantule, où leur fitness est meilleure.



**Figure 5 : Stratégie expérimentale proposée pour étudier l'effet du microbiote des graines sur leur cinétique de germination par l'usage de SynCom.** L'idée est ici de créer deux SynCom représentatives de deux lots dont les graines germent plus ou moins vite et de les échanger. Pour cela, il faudra stériliser les graines en surface et appliquer le microbiote 1 sur le lot 2 et inversement, puis suivre la cinétique de germination des graines recolonisées. Est-ce que les graines du lot 1 germent plus vite avec le microbiote du lot 2 et inversement ?



### **Quel est l'effet du microbiote sur la cinétique de germination des graines ?**

La cinétique de germination des graines des 9 géotypes de colza cultivés sur deux années a été mesurée dans le chapitre I. Au vu des résultats obtenus, notre hypothèse légitime était que le microbiote des graines de colza influence leur cinétique de germination. Cela n'a jamais été testé dans la littérature. Pour tester cette hypothèse, l'usage de SynCom serait une bonne approche (**Fig. 5**). Par exemple, il serait intéressant de constituer une SynCom représentative d'un géotype dont les graines germent rapidement et une seconde SynCom représentative d'un géotype dont les graines germent lentement. En échangeant les microbiotes, est ce que les graines germeraient plus, ou moins vite ? C'est une question qu'il faut élucider, car elle déterminerait le microbiote à privilégier pour favoriser la vitesse de germination de la graine. Par ailleurs, dans le chapitre III, les résultats nous indiquaient un potentiel effet de la vitesse de germination des graines dans la réponse de la plante au champignon pathogène *R. solani* R5, car les graines dont la vitesse de germination était plus lente (chapitre I) produisaient des plantes avec des symptômes plus forts. Si le microbiote de la graine influence effectivement la vitesse de germination des graines, il n'est pas exclu que cela puisse également influencer la réponse de la plante à une maladie tellurique précoce. De même, la diversité des SynCom appliquées sur graines semble moduler la vitesse de colonisation des graines en germination par les microorganismes du sol (Chapitre IV). Tester cette hypothèse avec des communautés constituées suivant un gradient de diversité permettrait de la confirmer. Ainsi, composition et diversité du microbiote des graines auraient un impact à la fois sur la vitesse de germination des graines, sur la colonisation des graines et des plantules par les microorganismes du sol, et indirectement sur la réponse de la plante à une maladie fongique précoce.

### **Passer de l'expérimentation contrôlée au champs → possibilité ou utopie ?**

La méthode employée dans le chapitre IV pour inoculer les graines avec les SynCom présente un inconvénient de taille : pour inoculer les graines il faut les stériliser en surface puis les tremper dans une suspension de SynCom, ce qui signifie qu'en les mouillant, on initie automatiquement l'imbibition et donc le processus de germination. On ne peut donc pas conserver les graines après recolonisation et on doit les semer immédiatement. Si elles ne sont pas semées, il est possible de les faire sécher, sans garantie que la qualité de la graine ne sera pas affectée par le traitement qu'elle a subi, ni



que les SynCom pourront se maintenir sur graine sèche. Cette méthode n'est donc pas adaptée pour des graines destinées à être semées au champs.

Pour apporter des microorganismes aux graines, plusieurs techniques ont été développées. Par exemple, le « seed coating » ou enrobage de graines, consistant au préalable à enrober les graines avec des fertilisants ou des pesticides, a été développé pour amorcer les graines avec des microorganismes d'intérêt afin de favoriser la germination ou aider à la défense directe contre des bio-agresseurs du sol (Bulgarelli *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2019; Ma, 2019). Cette technique permet de rendre disponibles des microorganismes aux abords de la graine en germination alors qu'ils ne se maintiendraient pas naturellement sur la graine sans enrobage. Une seconde méthode appelée « EndoSeed™ », consiste cette fois-ci à introduire des microorganismes par pulvérisation des fleurs avant la formation des graines (Mitter *et al.*, 2017). L'efficacité de cette méthode a été prouvée en conditions contrôlées mais également en champs, avec la souche *Paraburkholderia phytotfirmans* PsJN qui une fois pulvérisée, est retrouvée ensuite à l'intérieur des graines. Ces graines transmettent ensuite effectivement la bactérie dans l'endosphère des parties aériennes et racinaires, mais dans chaque compartiment (graines, racines, parties aériennes) la concentration de la bactérie varie fortement. L'avantage de cette méthode est que la bactérie étant endophyte, elle est protégée des variations environnementales que subirait des épiphytes ce qui garantit son maintien dans les graines (Mitter *et al.*, 2017; Sessitsch *et al.*, 2019).

Cependant, il n'est pas certain que cette technique produirait les mêmes résultats avec un consortium de bactéries non-endophytes et il conviendrait de tester cela avec une suspension de SynCom. En effet, comment assurer la transmission verticale de ces SynCom à la graine ? Si elles ne sont pas adaptées à l'habitat graine et qu'elles n'entrent pas à l'intérieur des tissus, elles n'ont aucune raison d'être effectivement retrouvées dans la graine. Dans le cas de la bactérie *P. phytotfirmans* PsJN, isolée de l'endosphère racinaire (Sessitsch *et al.*, 2005) celle-ci est en effet retrouvée dans la première génération de graines, mais à la génération suivante, elle disparaît des graines (Mitter *et al.*, 2017). Ainsi, il n'y a aucune garantie qu'un individu non adapté à l'habitat graine y soit transmis naturellement sur plusieurs générations. Dans cet exemple il ne s'agit certes pas de SynCom, mais cela illustre bien la nécessité de travailler avec des isolats de graines, qui ont plus de chances d'être transmis naturellement à la génération suivante sans qu'on ne



les y force. Cependant, même si les isolats sélectionnés sont adaptés à l'habitat graine, il n'est pas garanti qu'ils soient ensuite transmis verticalement par voie florale ou systémique, auquel cas même une fois implantés sur la première génération, leur transmission à la graine reste compromise. Si la transmission de ces isolats à la graine ne se fait que par voie externe, leur maintien sur plusieurs générations ne sera pas garanti et il faudra dans tous les cas intervenir pour les réintroduire. Par ailleurs, étant donné que la graine agit comme un goulot d'étranglement qui filtre le microbiote transmis à la génération suivante (Newcombe *et al.*, 2018), il n'est pas certain que plusieurs isolats puissent effectivement être transmis sur graines simultanément.

Une des possibilités qu'offrirait l'utilisation de SynCom provenant de graines, avec un potentiel garantissant la santé ou la croissance de la plante, serait de réussir à les faire se maintenir sur plantes en tant qu'agents combinés de bio-contrôle (Compant *et al.*, 2019), et pourquoi pas si possible sur plusieurs générations sans avoir besoin de les réintroduire.

Dans le chapitre IV, nous avons prouvé que des bactéries introduites sur graines peuvent se maintenir en abondance relativement élevée dans les différents compartiments de la plante et ce jusqu'à au moins 14 jours après semis dans un sol vivant. Afin de tester la possibilité d'une transmission verticale de SynCom sur plusieurs générations, il serait intéressant de suivre l'évolution de ces SynCom pendant tout le cycle de la plante, de la graine à la graine, toujours dans un sol de diversité microbienne connue et en échantillonnant l'ensemble des compartiments de la plante. Est-ce que ce que l'on met sur graine à la G0 est retrouvé sur graines à G1 et, si oui, est-ce que leur abondance reste satisfaisante ? Il y a fort à parier que l'on retrouve effectivement certains de ces isolats dans le microbiote des graines de la G1. Mais il serait ambitieux de penser que leur maintien naturel serait garanti au-delà d'une ou deux générations, à moins que certains de ces isolats deviennent généralistes des graines de colza.

En résumé, tant qu'un système n'est pas maîtrisé à 100%, il est peu probable que les résultats obtenus en conditions contrôlées soient transposables au champs (Parnell *et al.*, 2016). Il convient alors de prendre en compte de multiples aspects, notamment les variabilités environnementales et la nature microbienne et physico-chimique du sol qui sont les facteurs les plus importants dans la structuration du microbiote de la plante et notamment de la graine. Par ailleurs, il ne faut pas perdre de vue qu'à l'heure actuelle, les



SynCom sont constituées exclusivement d'isolats bactériens, tandis que dans le microbiote des plantes, il n'y a pas que les bactéries qui jouent un rôle. D'autre part, passer à l'expérimentation en champs est un véritable challenge où la communauté immigrante (SynCom ou microbiote naturel de la graine) doit s'adapter à un environnement variable et diversifié. Mais les études les plus récentes et les plus innovantes sur graines offrent des perspectives intéressantes et donnent bon espoir que cela devienne bientôt un peu plus qu'une simple utopie (Sessitsch *et al.*, 2019; Bailly *et al.*, 2019).





## CONCLUSION

---

Grâce à des manipulations originales, les conclusions supportées à travers les différents chapitres de cette thèse participent à différents niveaux de connaissances sur le microbiote des graines. Après avoir étudié les facteurs impliqués dans la structuration du microbiote des graines de colza, nous avons montré que des processus écologiques complexes sont impliqués dans sa transmission à la plantule. Enfin, nous avons prouvé que la constitution de communautés synthétiques est une méthode prometteuse pour palier à la variabilité du microbiote des graines, et que leur utilisation permet de mettre en évidence les liens entre diversité microbienne des graines, structuration du microbiote des plantules et implication dans la réponse à une maladie. Les connaissances apportées par notre étude permettent de proposer de nouvelles pistes à explorer dans l'utilisation et la manipulation du microbiote des graines, pour qu'on puisse un jour s'en servir comme vecteurs d'agents combinés de bio-contrôle pour une agriculture durable.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

---



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abarenkov K, Nilsson RH, Larsson K-H, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, *et al.* 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist* 186: 281–285.
- Abdelfattah A, Sanzani SM, Wisniewski M, Berg G, Cacciola SO, Schena L. 2019. Revealing Cues for Fungal Interplay in the Plant–Air Interface in Vineyards. *Frontiers in Plant Science* 10.
- Abuamsha R, Salman M, Ehlers R-U. 2011. Improvement of seed bio-priming of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas chlororaphis*. *Biocontrol Science and Technology* 21: 199–213.
- Adam E, Bernhart M, Müller H, Winkler J, Berg G. 2018. The Cucurbita pepo seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil* 422: 35–49.
- Aglar MT, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim S-T, Weigel D, Kemen EM. 2016. Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *PLOS Biology* 14: e1002352.
- Ajayi-Oyetunde OO, Bradley CA. 2017. Identification and Characterization of *Rhizoctonia* Species Associated with Soybean Seedling Disease. *Plant Disease* 101: 520–533.
- Ajayi-Oyetunde OO, Bradley CA. 2018. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology* 67: 3–17.
- Aleklett K, Hart M. 2013. The root microbiota—a fingerprint in the soil? *Plant and Soil* 370: 671–686.
- Aleklett K, Hart M, Shade A. 2014. The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. *Botany* 92: 253–266.
- Alkooranee JT, Kadhum NN, Aledan TR, Al-farhan IMH. 2017. Induced Systemic Resistance in Oilseed Rape by Some Bio-Elicitors Agents Against Rot Roots Diseases Caused by *Rhizoctonia solani*. *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 5: 1–9.
- Allard SM, Ottesen AR, Brown EW, Micallef SA. 2018. Insect exclusion limits variation in bacterial microbiomes of tomato flowers and fruit. *Journal of Applied Microbiology* 125: 1749–1760.
- Allard SM, Ottesen AR, Micallef SA. 2020. Rain induces temporary shifts in epiphytic bacterial communities of cucumber and tomato fruit. *Scientific Reports* 10.
- Alonso P, Blondin L, Gladieux P, Mahé F, Sanguin H, Ferdinand R, Filloux D, Desmarais E, Cerqueira F, Jin B, *et al.* 2020. Heterogeneity of the rice microbial community of the Chinese centuries-old Honghe Hani rice terraces system. *Environmental Microbiology* 22: 3429–3445.



- Alström S. 2001. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology* 149: 57–64.
- American Phytopathological Society. 2016. *Phytobiomes: A Roadmap for Research and Translation*. St. Paul, MN.
- Anderson NA. 1982. The Genetics and Pathology of *Rhizoctonia Solani*. *Annual Review of Phytopathology* 20: 329–347.
- Anderson MJ. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32–46.
- Andrews JH, Harris RF. 2000. The Ecology and Biogeography of Microorganisms on Plant Surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38: 145–180.
- Armanhi JSL, de Souza RSC, de Araújo LM, Okura VK, Mieczkowski P, Imperial J, Arruda P. 2016. Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. *Scientific Reports* 6: 29543.
- Aßhauer KP, Wemheuer B, Daniel R, Meinicke P. 2015. Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* 31: 2882–2884.
- Baas-Becking LGM. 1934. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. *The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon*.
- Bai Y, Müller DB, Srinivas G, Garrido-Oter R, Potthoff E, Rott M, Dombrowski N, Münch PC, Spaepen S, Remus-Emsermann M, *et al.* 2015. Functional overlap of the *Arabidopsis leaf* and root microbiota. *Nature* 528: 364–369.
- Bailly C, Bousquet A, Braun V, Buitink J, Desbois-Vimont C, Durand Tardif M, Fougereux JA, A G, A G, Grappin P, *et al.* 2019. Towards seed protection using biocontrol strategies. In: Consortium Biocontrôle et GIS Biotechnologies Vertes (Position paper, fruit des échanges de l'atelier scientifique "Semences et Biocontrôle" du 2 octobre 2019 à Paris). paris, France, 12p.
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* 134: 307–319.
- Baker ME, King RS. 2010. A new method for detecting and interpreting biodiversity and ecological community thresholds. *Methods in Ecology and Evolution* 1: 25–37.
- Bakker MG, Schlatter DC, Otto-Hanson L, Kinkel LL. 2014. Diffuse symbioses: roles of plant-plant, plant-microbe and microbe-microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Molecular Ecology* 23: 1571–1583.
- Baltrus DA. 2017. Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes. *Current Opinion in Plant Biology* 38: 109–116.
- Banerjee S, Schlaeppi K, van der Heijden MGA. 2018. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology* 16: 567–576.





- Barret M, Briand M, Bonneau S, Prévieux A, Valière S, Bouchez O, Hunault G, Simoneau P, Jacques M-A. 2015. Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1257–1266.
- Barret M, Guimbaud J-F, Darrasse A, Jacques M-A. 2016. Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms: Plant microbiota affects seed transmission. *Molecular Plant Pathology* 17: 791–795.
- de Bary A. 1879. *Die Erscheinung der Symbiose: Vortrag gehalten auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte zu Cassel.* Trübner.
- Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E. 2016. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinformatics and Biology Insights* 10: BBI.S34610.
- Baumann P, Baumann L, Clark MA, Thao ML. 1998. *Buchnera aphidicola*: The endosymbiont of aphids. *ASM News* 64: 203–209.
- Beans C. 2017. Core Concept: Probing the phytobiome to advance agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 8900–8902.
- Bentsink L, Koornneef M. 2008. Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 6.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17: 478–486.
- Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès M-CC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH, *et al.* 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8: 103.
- Bertolini E, Teresani GR, Loiseau M, Tanaka F a. O, Barbé S, Martínez C, Gentit P, López MM, Cambra M. 2015. Transmission of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' in carrot seeds. *Plant Pathology* 64: 276–285.
- Bewley JD. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*: 1055–1066.
- Bodenhausen N, Bortfeld-Miller M, Ackermann M, Vorholt JA. 2014. A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota (U Hentschel, Ed.). *PLoS Genetics* 10: e1004283.
- Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. 2013. Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana* (AM Ibekwe, Ed.). *PLoS ONE* 8: e56329.
- Bodenhausen N, Somerville V, Desirò A, Walser J-C, Borghi L, van der Heijden MGA, Schlaeppi K. 2019. *Petunia*- and *Arabidopsis*-Specific Root Microbiota Responses to Phosphate Supplementation. *Phytobiomes Journal* 3: 112–124.
- Bordenstein SR, Theis KR. 2015. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biology* 13: e1002226.



- Bouffaud M-L, Kyselková 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.
- Bouffaud M-L, Poirier M-A, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. 2014. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. *Environmental Microbiology* 16: 2804–2814.
- Bray JR, Curtis JT. 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 325–349.
- Brooks AW, Kohl KD, Brucker RM, Opstal EJ van, Bordenstein SR. 2016. Phyllosymbiosis: Relationships and Functional Effects of Microbial Communities across Host Evolutionary History. *PLOS Biology* 14: e2000225.
- Brugman S, Ikeda-Ohtsubo W, Braber S, Folkerts G, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2018. A Comparative Review on Microbiota Manipulation: Lessons From Fish, Plants, Livestock, and Human Research. *Frontiers in Nutrition* 5.
- Budge GE, Shaw MW, Colyer A, Pietravalle S, Boonham N. 2009a. Molecular tools to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. *Plant Pathology* 58: 1071–1080.
- Budge GE, Shaw MW, Lambourne C, Jennings P, Clayburn R, Boonham N, McPherson M. 2009b. Characterization and origin of infection of *Rhizoctonia solani* associated with *Brassica oleracea* crops in the UK. *Plant Pathology* 58: 1059–1070.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184: 449–456.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy AC, Schulze-Lefert P. 2015. Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host & Microbe* 17: 392–403.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, et al. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488: 91–95.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807–838.
- Butel M-J, Waligora-Dupriet A-J, Wydau-Dematteis S. 2018. The developing gut microbiota and its consequences for health. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 9: 590–597.
- Calderón K, Spor A, Breuil M-C, Bru D, Bizouard F, Violle C, Barnard RL, Philippot L. 2017. Effectiveness of ecological rescue for altered soil microbial communities and functions. *The ISME Journal* 11: 272–283.



- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 11: 2639–2643.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13: 581–583.
- Calmes B, Guillemette T, Teyssier L, Siegler B, Pigné S, Landreau A, Iacomi B, Lemoine R, Richomme P, Simoneau P. 2013. Role of mannitol metabolism in the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Frontiers in Plant Science* 4: 131.
- del Campo R, Russi P, Mara P, Mara H, Peyrou M, de León IP, Gaggero C. 2009. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS microbiology letters* 298: 143–148.
- de Campos SB, Youn J-W, Farina R, Jaenicke S, Jünemann S, Szczepanowski R, Beneduzi A, Vargas LK, Goesmann A, Wendisch VF, *et al.* 2013. Changes in Root Bacterial Communities Associated to Two Different Development Stages of Canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) Evaluated through Next-Generation Sequencing Technology. *Microbial Ecology* 65: 593–601.
- Campos EVR, Proença PLF, Oliveira JL, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF. 2019. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecological Indicators* 105: 483–495.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. 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.
- Card SD, Hume DE, Roodi D, McGill CR, Millner JP, Johnson RD. 2015. Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica* – A review. *Biological Control* 90: 102–112.
- Carling DE. 1996. Grouping in *Rhizoctonia Solani* by Hyphal Anastomosis Reaction. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Springer Netherlands, 37–47.
- Carlström CI, Field CM, Bortfeld-Miller M, Müller B, Sunagawa S, Vorholt JA. 2019. Synthetic microbiota reveal priority effects and keystone strains in the *Arabidopsis* phyllosphere. *Nature Ecology & Evolution* 3: 1445–1454.
- Castledine M, Sierocinski P, Padfield D, Buckling A. 2020. Community coalescence: an evolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375: 20190252.
- Chahtane H, Nogueira Füller T, Allard P-M, Marcourt L, Ferreira Queiroz E, Shanmugabalaji V, Falquet J, Wolfender J-L, Lopez-Molina L. 2018. The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in *Arabidopsis* (CS Hardtke and DJ Kliebenstein, Eds.). *eLife* 7: e37082.



- Chambó ED, Camargo SC, Garcia RC, Carvalho CAL, Ruvolo-Takasusuki MCC, Ronqui L, Júnior CS, Santos PR, Toledo V de AA de. 2018. Benefits of Entomophile Pollination in Crops of *Brassica napus* and Aspects of Plant Floral Biology. *Brassica Germplasm - Characterization, Breeding and Utilization*.
- Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. 2013. Root Exudation of Phytochemicals in Arabidopsis Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. *PLOS ONE* 8: e55731.
- Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal* 8: 790–803.
- Chapelle E, Mendes R, Bakker PAH, Raaijmakers JM. 2016. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *The ISME Journal* 10: 265–268.
- Chen H, Boutros PC. 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12: 35.
- Chen T, Nomura K, Wang X, Sohrabi R, Xu J, Yao L, Paasch BC, Ma L, Kremer J, Cheng Y, *et al.* 2020. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature* 580: 653–657.
- Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, Nacamulli C, Tabacchioni S. 1998. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Applied Soil Ecology* 8: 11–18.
- Clarke WE, Higgins EE, Plieske J, Wieseke R, Sidebottom C, Khedikar Y, Batley J, Edwards D, Meng J, Li R, *et al.* 2016. A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theoretical and Applied Genetics* 129: 1887–1899.
- Coince A, Cordier T, Lengellé J, Defossez E, Vacher C, Robin C, Buée M, Marçais B. 2014. Leaf and Root-Associated Fungal Assemblages Do Not Follow Similar Elevational Diversity Patterns. *PLoS ONE* 9.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porrás-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42: D633–D642.
- 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.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H, Sessitsch A. 2011. Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *Microbial Ecology* 62: 188–197.





- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1685–1693.
- Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. 2019. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research* 19: 29–37.
- Compant S, Vacher C. 2019. Sources, niches and routes of colonization by beneficial bacterial endophytes. In: *Endophyte Biotechnology: Potential for Agriculture and Pharmacology*. CABI.
- Cope-Selby N, Cookson A, Squance M, Donnison I, Flavell R, Farrar K. 2017. Endophytic bacteria in *Miscanthus* seed: implications for germination, vertical inheritance of endophytes, plant evolution and breeding. *GCB Bioenergy* 9: 57–77.
- Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Fabreguettes O, Desprez-Loustau M-L, Vacher C. 2012. The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist* 196: 510–519.
- Cordovez V, Dini-Andreote F, Carrión VJ, Raaijmakers JM. 2019. Ecology and Evolution of Plant Microbiomes. *Annual Review of Microbiology* 73: 69–88.
- Danielsson J, Reva O, Meijer J. 2007. Protection of Oilseed Rape (*Brassica napus*) Toward Fungal Pathogens by Strains of Plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial Ecology* 54: 134–140.
- Darrasse A, Barret M, Cesbron S, Compant S, Jacques M-A. 2018. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant and Soil* 422: 115–128.
- Darrasse A, Bureau C, Samson R, Morris CE, Jacques M-A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119: 203–215.
- Darrasse A, Darsonval A, Boureau T, Brisset M-N, Durand K, Jacques M-A. 2010. Transmission of Plant-Pathogenic Bacteria by Nonhost Seeds without Induction of an Associated Defense Reaction at Emergence. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6787–6796.
- Darsonval A, Darrasse A, Durand K, Bureau C, Cesbron S, Jacques M-A. 2009. Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 747–757.
- Darsonval A, Darrasse A, Meyer D, Demarty M, Durand K, Bureau C, Manceau C, Jacques M-A. 2008. The Type III Secretion System of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* Is Involved in the Phyllosphere Colonization Process and in Transmission to Seeds of Susceptible Beans. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2669–2678.



- Daval S, Gazengel K, Belcour A, Linglin J, Guillerm-Erckelboudt A-Y, Sarniguet A, Manzanares-Dauleux MJ, Lebreton L, Mougel C. 2020. Soil microbiota influences clubroot disease by modulating *Plasmodiophora brassicae* and *Brassica napus* transcriptomes. *bioRxiv*. 2020.02.05.935510.
- Daval S, Lebreton L, Gazengel K, Boutin M, Guillerm-Erckelboudt A-Y, Sarniguet A. 2011. The biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp strain affects the pathogenesis-related gene expression of the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat roots: Take-all fungus and *Pseudomonas* interactions. *Molecular Plant Pathology* 12: 839–854.
- Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6.
- De Meester L, Vanoverbeke J, Kilsdonk LJ, Urban MC. 2016. Evolving Perspectives on Monopolization and Priority Effects. *Trends in Ecology & Evolution* 31: 136–146.
- De Meyer F, Danneels B, Acar T, Rasolomampianina R, Rajaonah MT, Jeannoda V, Carlier A. 2019. Adaptations and evolution of a heritable leaf nodule symbiosis between *Dioscorea sansibarensis* and *Orrella dioscoreae*. *The ISME Journal* 13: 1831–1844.
- Delahaie J. 2013. Comparaison moléculaire des graines orthodoxes de *Medicago truncatula* et récalcitrantes de *Castanospermum australe*: une nouvelle approche pour comprendre l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. *Thèse de doctorat de l'université d'Angers*.
- Delgado-Baquerizo M, Oliverio AM, Brewer TE, Benavent-González A, Eldridge DJ, Bardgett RD, Maestre FT, Singh BK, Fierer N. 2018. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 359: 320–325.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, von Mering C, Vorholt JA. 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 16428–16433.
- Depotter JRL, Deketelaere S, Inderbitzin P, Tiedemann AV, Höfte M, Subbarao KV, Wood TA, Thomma BPHJ. 2016. *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts: *Verticillium longisporum*, causal agent of stem striping. *Molecular Plant Pathology* 17: 1004–1016.
- Dobson HEM, Peng Y-S. 1997. Digestion of Pollen Components by Larvae of the Flower-Specialist Bee *Chelostoma florissomne* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Insect Physiology* 43: 89–100.
- Dohrmann AB, Küting M, Jünemann S, Jaenicke S, Schlüter A, Tebbe CC. 2013. Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt - and conventional maize varieties. *The ISME Journal* 7: 37–49.
- Dombrowski N, Schlaeppli K, Agler MT, Hacquard S, Kemen E, Garrido-Oter R, Wunder J, Coupland G, Schulze-Lefert P. 2017. Root microbiota dynamics of perennial *Arabidopsis*



- alpina* are dependent on soil residence time but independent of flowering time. *The ISME Journal* 11: 43–55.
- Douglas AE. 1996. Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. *Journal of Insect Physiology* 42: 247–255.
- Douglas AE, Werren JH. 2016. Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. *mBio* 7.
- Downey RK, Rimmer SR. 1994. Agronomic Improvement in Oilseed Brassicas. *Advances in Agronomy* 50: 1–66.
- Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R, Agler M, Kemen E, Schulze-Lefert P, Hacquard S. 2018. Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote *Arabidopsis* Survival. *Cell* 175: 973–983.e14.
- Dutta B, Scherm H, Gitaitis RD, Walcott RR. 2012. *Acidovorax citrulli* Seed Inoculum Load Affects Seedling Transmission and Spread of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Under Greenhouse Conditions. *Plant Disease* 96: 705–711.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E911–E920.
- Edwards JA, Santos-Medellín CM, Liechty ZS, Nguyen B, Lurie E, Eason S, Phillips G, Sundaresan V. 2018. Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice. *PLoS Biology* 16: e2003862.
- Etalo DW, Jeon J-S, Raaijmakers JM. 2018. Modulation of plant chemistry by beneficial root microbiota. *Natural Product Reports* 35: 398–409.
- Fadiji AE, Babalola OO. 2020. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. *Journal of Microbiological Methods* 170: 105860.
- Faith DP. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61: 1–10.
- Fan X-L, Barrett SCH, Lin H, Chen L-L, Zhou X, Gao J-Y. 2012. Rain pollination provides reproductive assurance in a deceptive orchid. *Annals of Botany* 110: 953–958.
- Faure D, Vereecke D, Leveau JHJ. 2009. Molecular communication in the rhizosphere. *Plant and Soil* 321: 279–303.
- Field KG, Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Ghiselin MT, Raff EC, Pace NR, Raff RA. 1988. Molecular Phylogeny of the Animal Kingdom. *Science* 239: 748–753.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 626–631.
- Finch-Savage WE, Bassel GW. 2016. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *Journal of Experimental Botany* 67: 567–591.



- Fischer D, Gessner G, Fill TP, Barnett R, Tron K, Dornblut K, Kloss F, Stallforth P, Hube B, Heinemann SH, *et al.* 2019. Disruption of Membrane Integrity by the Bacterium-Derived Antifungal Jagaricin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63.
- Fitzpatrick CR, Copeland J, Wang PW, Guttman DS, Kotanen PM, Johnson MTJ. 2018. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E1157–E1165.
- Fitzpatrick CR, Salas-González I, Conway JM, Finkel OM, Gilbert S, Russ D, Teixeira PJPL, Dangl JL. 2020. The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annual Review of Microbiology* 74: annurev-micro-022620-014327.
- Flury P, Vesga P, Dominguez-Ferreras A, Tinguely C, Ullrich CI, Kleespies RG, Keel C, Maurhofer M. 2019. Persistence of root-colonizing *Pseudomonas protegens* in herbivorous insects throughout different developmental stages and dispersal to new host plants. *The ISME Journal* 13: 860–872.
- Foley RC, Kidd BN, Hane JK, Anderson JP, Singh KB. 2016. Reactive Oxygen Species Play a Role in the Infection of the Necrotrophic Fungi, *Rhizoctonia solani* in Wheat. *PLOS ONE* 11: e0152548.
- Fones H, Preston GM. 2012. Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Letters* 327: 1–8.
- Fong W, Li Q, Yu J. 2020. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene*: 1–19.
- Fouquier J, Rideout JR, Bolyen E, Chase J, Shiffer A, McDonald D, Knight R, Caporaso JG, Kelley ST. 2016. ghost-tree: creating hybrid-gene phylogenetic trees for diversity analyses. *Microbiome* 4: 11.
- Frank A-B. 1877. Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. In: Beiträge zur Biologie der Pflanzen II. 123–200.
- Fukami T. 2015. Historical Contingency in Community Assembly: Integrating Niches, Species Pools, and Priority Effects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 46: 1–23.
- Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. 2002. Phylogenetic Analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* Strains on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2779–2785.
- Fürnkranz M, Lukesch B, Müller H, Huss H, Grube M, Berg G. 2012. Microbial Diversity Inside Pumpkins: Microhabitat-Specific Communities Display a High Antagonistic Potential Against Phytopathogens. *Microbial Ecology* 63: 418–428.
- Gaff DF, Oliver M. 2013. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Functional Plant Biology* 40: 315.
- Gao C-H, Cao H, Cai P, Sørensen SJ. 2020. The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. *The ISME Journal*: 1–12.





- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. 2004. MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243–270.
- Ghezzi null, Steck null. 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS microbiology ecology* 30: 203–208.
- Gilbert JA, Jansson JK, Knight R. 2014. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology* 12: 69.
- Gilligan C, Bailey DJ. 1997. Components of pathozone behavior. *New Phytologist* 135: 475–490.
- Gitaitis R, Walcott R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 45: 371–397.
- Gkarmiri K, Mahmood S, Ekblad A, Alström S, Högborg N, Finlay R. 2017. Identifying the Active Microbiome Associated with Roots and Rhizosphere Soil of Oilseed Rape (FE Loeffler, Ed.). *Applied and Environmental Microbiology* 83.
- Goggin DE, Emery RJN, Kurepin LV, Powles SB. 2015. A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Annals of Botany* 115: 293–301.
- Granér G, Persson P, Meijer J, Alström S. 2003. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters* 224: 269–276.
- Green SJ, Inbar E, Michel FC, Hadar Y, Minz D. 2006. Succession of Bacterial Communities during Early Plant Development: Transition from Seed to Root and Effect of Compost Amendment. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3975–3983.
- Gu S, Wei Z, Shao Z, Friman V-P, Cao K, Yang T, Kramer J, Wang X, Li M, Mei X, *et al.* 2020. Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. *Nature Microbiology*.
- Gugel RK, Yitbarek SM, Verma PR, Morrall RAA, Sadasivaiah RS. 1987. Etiology of the rhizoctonia root rot complex of canola in the Peace River region of Alberta. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9: 119–128.
- Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P. 2017. Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology* 55: 565–589.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5: R245–R249.
- Hannukkala AO, Rastas M, Laitinen P, Latvala S. 2016. Rhizoctonia solani injuries in oilseed crops in Finland and impacts of different crop management practices on disease incidence and severity. *Annals of Applied Biology* 169: 257–273.



- Hardoim PR, Hardoim CCP, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2012. Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages (SE Baker, Ed.). *PLoS ONE* 7: e30438.
- Hartmann A, Rothballer M, Schmid M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* 312: 7–14.
- Hashizume Y, Sahashi N, Fukuda K. 2008. The influence of altitude on endophytic mycobiota in *Quercus acuta* leaves collected in two areas 1000 km apart. *Forest Pathology* 38: 218–226.
- Hassani MA, Durán P, Hacquard S. 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6.
- He H, Ye Z, Yang D, Yan J, Xiao L, Zhong T, Yuan M, Cai X, Fang Z, Jing Y. 2013. Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere* 90: 1960–1965.
- Heijden MGA, Bardgett RD, Straalen NMV. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296–310.
- Heintz-Buschart A, Wilmes P. 2018. Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends in Microbiology* 26: 563–574.
- Helfrich E, Vogel CM, Ueoka R, Schäfer M, Ryffel F, Müller DB, Probst S, Kreuzer M, Piel J, Vorholt JA. 2018. Bipartite interactions, antibiotic production and biosynthetic potential of the *Arabidopsis* leaf microbiome. *Nature Microbiology* 3: 909–919.
- Herrera Paredes S, Gao T, Law TF, Finkel OM, Mucyn T, Teixeira PJ, Salas González I, Feltcher ME, Powers MJ, Shank EA, et al. 2018. Design of synthetic bacterial communities for predictable plant phenotypes (E Kemen, Ed.). *PLOS Biology* 16: e2003962.
- Hiltner L. 1904. Über nevere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Beurchsichtigung der Grundungung und Broche. *Arbeit. Deut. Landw. Ges. Berlin* 98: 59–78.
- Hilton S, Bennett AJ, Chandler D, Mills P, Bending GD. 2018. Preceding crop and seasonal effects influence fungal, bacterial and nematode diversity in wheat and oilseed rape rhizosphere and soil. *Applied Soil Ecology* 126: 34–46.
- Hinsu AT, Patel AB, Pandit RJ, Thakkar JR, Shah RK, Jakhesara SJ, Koringa PG, Joshi CG. 2020. MetaRNAseq analysis of surti buffalo rumen content reveals that transcriptionally active microorganisms need not be abundant. *Molecular Biology Reports* 47: 5101–5114.
- Hooks KB, O'Malley MA. 2017. Dysbiosis and Its Discontents. *mBio* 8.
- Horton MW, Bodenhausen N, Beilsmith K, Meng D, Muegge BD, Subramanian S, Vetter MM, Vilhjálmsson BJ, Nordborg M, Gordon JI, et al. 2014. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana*'s leaf microbial community. *Nature communications* 5: 5320.



- Houlden A, Timms-Wilson TM, Day MJ, Bailey MJ. 2008. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 193–201.
- Hu X, Roberts DP, Maul JE, Emche SE, Liao X, Guo X, Liu Y, McKenna LF, Buyer JS, Liu S. 2011. Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field trials conducted at separate locations. *Canadian Journal of Microbiology* 57: 539–546.
- Hu J, Wei Z, Friman V-P, Gu S, Wang X, Eisenhauer N, Yang T, Ma J, Shen Q, Xu Y, *et al.* 2016. Probiotic Diversity Enhances Rhizosphere Microbiome Function and Plant Disease Suppression. *mBio* 7.
- Huang WM. 1996. Bacterial Diversity Based on Type Ii Dna Topoisomerase Genes. *Annual Review of Genetics* 30: 79–107.
- Hubbell SP. 2001. *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography (MPB-32)*. Princeton University Press.
- Huey CJ, Gopinath SCB, Uda MNA, Zulhaimi HI, Jaafar MN, Kasim FH, Yaakub ARW. 2020. Mycorrhiza: a natural resource assists plant growth under varied soil conditions. *3 Biotech* 10: 204.
- Hwang S-F, Strelkov SE, Feng J, Gossen BD, Howard RJ. 2012. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular Plant Pathology* 13: 105–113.
- Ikeda S, Anda M, Inaba S, Eda S, Sato S, Sasaki K, Tabata S, Mitsui H, Sato T, Shinano T, *et al.* 2011. Autoregulation of Nodulation Interferes with Impacts of Nitrogen Fertilization Levels on the Leaf-Associated Bacterial Community in Soybeans. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1973–1980.
- Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. 2014. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science* 64: 48–59.
- Jaccard P. 1901. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37: 547–579.
- Jiang N, Lv QY, Xu X, Cao YS, Walcott RR, Li JQ, Luo LX. 2016. Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and in planta resuscitation of the cells on tomato seedlings. *Plant Pathology* 65: 826–836.
- Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong B-Y, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, *et al.* 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 10: 5029.
- Johnson KL, Walcott RR. 2013. Quorum Sensing Contributes to Seed-to-Seedling Transmission of *Acidovorax citrulli* on Watermelon. *Journal of Phytopathology* 161: 562–573.



- Johnston-Monje D, Raizada MN. 2011. Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology (MTP Gilbert, Ed.). *PLoS ONE* 6: e20396.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature reviews. Microbiology* 5: 619–633.
- Jousset A, Bienhold C, Chatzinotas A, Gallien L, Gobet A, Kurm V, Küsel K, Rillig MC, Rivett DW, Salles JF, *et al.* 2017. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *The ISME Journal* 11: 853–862.
- Kaplan HB, Greenberg EP. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of Bacteriology* 163: 1210–1214.
- Kataria HR, Verma PR. 1992. *Rhizoctonia solani* damping-off and root rot in oilseed rape and canola. *Crop Protection* 11: 8–13.
- Kehe J, Kulesa A, Ortiz A, Ackerman CM, Thakku SG, Sellers D, Kuehn S, Gore J, Friedman J, Blainey PC. 2019. Massively parallel screening of synthetic microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 12804–12809.
- Keijer J, Korsman MG, Dullemans AM, Houterman PM, Bree JD, Silfhout CHV. 1997. In vitro analysis of host plant specificity in *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology* 46: 659–669.
- Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, Blomberg SP, Webb CO. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26: 1463–1464.
- Kennedy SR, Prost S, Overcast I, Rominger AJ, Gillespie RG, Krehenwinkel H. 2020. High-throughput sequencing for community analysis: the promise of DNA barcoding to uncover diversity, relatedness, abundances and interactions in spider communities. *Development Genes and Evolution* 230: 185–201.
- Kerdraon L, Balesdent M-H, Barret M, Laval V, Suffert F. 2019. Crop Residues in Wheat-Oilseed Rape Rotation System: a Pivotal, Shifting Platform for Microbial Meetings. *Microbial Ecology* 77: 931–945.
- Khalaf E, Raizada M. 2018. Bacterial Seed Endophytes of Domesticated Cucurbits Antagonize Fungal and Oomycete Pathogens Including Powdery Mildew. *Front. Microbiol.*
- Kiefer M, Schmickl R, German DA, Mandáková T, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Franzke A, Mummenhoff K, Stamatakis A, Koch MA. 2014. BrassiBase: Introduction to a Novel Knowledge Database on Brassicaceae Evolution. *Plant and Cell Physiology* 55: e3–e3.
- Kim H, Lee KK, Jeon J, Harris WA, Lee Y-H. 2020. Domestication of *Oryza* species evolutionarily shapes bacterial and fungal communities in rice seed. *Microbiome* 8.
- Klaedtke S, Jacques M-A, Raggi L, Préveaux A, Bonneau S, Negri V, Chable V, Barret M. 2016. Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages: Terroir shapes the seed microbiota. *Environmental Microbiology* 18: 1792–1804.





- Kleiman C. 2001. *La reproduction des angiospermes*. Belin.
- Knief C, Ramette A, Frances L, Alonso-Blanco C, Vorholt JA. 2010. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *The ISME Journal* 4: 719–728.
- Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüscheweiler B, Ceccatelli S, Dinovi M, Edler L, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, *et al.* 2016. Erucic acid in feed and food. *EFSA Journal* 14: e04593.
- Kohl KD. 2020. Ecological and evolutionary mechanisms underlying patterns of phyllosymbiosis in host-associated microbial communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375: 20190251.
- Kun X, Jucai H, Huiping L. 2005. A preliminary study on the inhibitory effect of an endophytic bacterium yc8 isolated from rape. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* 27: 852–856.
- Kwak M-J, Kong HG, Choi K, Kwon S-K, Song JY, Lee J, Lee PA, Choi SY, Seo M, Lee HJ, *et al.* 2018. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology* 36: 1100–1109.
- La Duc MT, Satomi M, Agata N, Venkateswaran K. 2004. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *Journal of Microbiological Methods* 56: 383–394.
- Lachaise T, Ourry M, Lebreton L, Guillerm-Erckelboudt A-Y, Linglin J, Paty C, Chaminade V, Marnet N, Aubert J, Poinot D, *et al.* 2017. Can soil microbial diversity influence plant metabolites and life history traits of a rhizophagous insect? A demonstration in oilseed rape. *Insect Science* 24: 1045–1056.
- Lackey JB. 1956. Stream Enrichment and Microbiota. *Public Health Reports (1896-1970)* 71: 708.
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, *et al.* 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology* 31: 814–821.
- Leach JE, Triplett LR, Argueso CT, Trivedi P. 2017. Communication in the Phytobiome. *Cell* 169: 587–596.
- Lederberg J, Tatum EL. 1946. Gene Recombination in *Escherichia Coli*. *Nature* 158: 558–558.
- Leff JW, Lynch RC, Kane NC, Fierer N. 2017. Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. *New Phytologist* 214: 412–423.
- Lei L. 2020. Phyllosphere dysbiosis. *Nature Plants* 6: 434–434.



- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S, Buitink J. 2017. Late seed maturation: drying without dying. *Journal of Experimental Botany* 68: 827–841.
- Letunic I, Bork P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 47: W256–W259.
- Lex A, Gehlenborg N, Strobel H, Vuillemot R, Pfister H. 2014. UpSet: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics* 20: 1983–1992.
- Li P, Xue Y, Shi J, Pan A, Tang X, Ming F. 2018. The response of dominant and rare taxa for fungal diversity within different root environments to the cultivation of Bt and conventional cotton varieties. *Microbiome* 6: 184.
- Lindemann J, Upper CD. 1985. Aerial Dispersal of Epiphytic Bacteria over Bean Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 1229–1232.
- Lindow SE. 1996. Role of Immigration and Other Processes in Determining Epiphytic Bacterial Populations. In: Morris CE, Nicot PC, Nguyen-The C, eds. *Aerial Plant Surface Microbiology*. Boston, MA: Springer US, 155–168.
- Lindow SE, Brandl MT. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1875–1883.
- Lindow SE, Leveau JHJ. 2002. Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 238–243.
- Links MG, Demeke T, Gräfenhan T, Hill JE, Hemmingsen SM, Dumonceaux TJ. 2014. Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on *Triticum* and *Brassica* seeds. *The New Phytologist* 202: 542–553.
- Liu H, Brettell LE, Singh B. 2020. Linking the Phyllosphere Microbiome to Plant Health. *Trends in Plant Science*.
- Liu AX, Li Z, Wang ZM, Liang YC, Zhu XP. 2014. Identification of *Rhizoctonia solani* AG1-IB as a causal agent of leaf blight in *Cynanchum paniculatum* in China. *Journal of General Plant Pathology* 80: 94–98.
- Liu J, Nagabhyru P, Schardl CL. 2017. *Epichloë festucae* endophytic growth in florets, seeds, and seedlings of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycologia* 109: 691–700.
- Liu Y, Zuo S, Xu L, Zou Y, Song W. 2012. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Archives of Microbiology* 194: 1001–1012.
- Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8228–8235.
- Lundberg DS, Ayutthaya PPN, Strauß A, Shirsekar G, Lo W-S, Lahaye T, Weigel D. 2020. Measuring both microbial load and diversity with a single amplicon sequencing library. *Bioengineering*.



- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, Rio TG del, *et al.* 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488: 86–90.
- Lynch MDJ, Neufeld JD. 2015. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Reviews Microbiology* 13: 217–229.
- Ma Y. 2019. Seed coating with beneficial microorganisms for precision agriculture. *Biotechnology Advances* 37: 107423.
- Maignien L, DeForce EA, Chafee ME, Eren AM, Simmons SL. 2014. Ecological Succession and Stochastic Variation in the Assembly of *Arabidopsis thaliana* Phyllosphere Communities. *mBio* 5.
- Mallon CA, Elsas JD van, Salles JF. 2015a. Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms. *Trends in Microbiology* 23: 719–729.
- Mallon CA, Le Roux X, van Doorn GS, Dini-Andreote F, Poly F, Salles JF. 2018. The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. *The ISME Journal* 12: 728–741.
- Mallon CA, Poly F, Le Roux X, Marring I, van Elsas JD, Salles JF. 2015b. Resource pulses can alleviate the biodiversity—invasion relationship in soil microbial communities. *Ecology* 96: 915–926.
- Manching HC, Balint-Kurti PJ, Stapleton AE. 2014. Southern leaf blight disease severity is correlated with decreased maize leaf epiphytic bacterial species richness and the phyllosphere bacterial diversity decline is enhanced by nitrogen fertilization. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Margulis L, Fester R. 1991. Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis. *Cambridge, MA, MIT Press*.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17: 10–12.
- Martinson EO, Herre EA, Machado CA, Arnold AE. 2012. Culture-Free Survey Reveals Diverse and Distinctive Fungal Communities Associated with Developing Figs (*Ficus* spp.) in Panama. *Microbial Ecology* 64: 1073–1084.
- Martiny AC, Treseder K, Pusch G. 2013. Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. *The ISME Journal* 7: 830–838.
- Mason AS, Higgins EE, Snowdon RJ, Batley J, Stein A, Werner C, Parkin IAP. 2017. A user guide to the Brassica 60K Illumina Infinium™ SNP genotyping array. *Theoretical and Applied Genetics* 130: 621–633.
- Masson F, Leclerc C. 2014. Le Catalogue Officiel : un outil évolutif au service de l'agriculture et de sa multiperformance. *Agronomie Environnement & Sociétés* 4: 37–45.



- Maude RB. 1996. Seedborne diseases and their control: principles and practice. *CAB International, Wallingford, axon, UK*.
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science* 166: 525–530.
- Mazel F, Davis KM, Loudon A, Kwong WK, Groussin M, Parfrey LW. 2018. Is Host Filtering the Main Driver of Phylosymbiosis across the Tree of Life? *mSystems* 3.
- Mazzola M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 557–564.
- McFrederick QS, Thomas JM, Neff JL, Vuong HQ, Russell KA, Hale AR, Mueller UG. 2017. Flowers and Wild Megachilid Bees Share Microbes. *Microbial Ecology* 73: 188–200.
- McMurdie PJ, Holmes S. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8.
- McPhail KL, Armstrong DJ, Azevedo MD, Banowetz GM, Mills DI. 2010. 4-Formylaminoxyvinylglycine, an Herbicidal Germination-Arrest Factor from *Pseudomonas* Rhizosphere Bacteria. *Journal of Natural Products* 73: 1853–1857.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 634–663.
- Mendes R, Kruijt M, Bruijn I de, Dekkers E, Voort M van der, Schneider JHM, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM, *et al.* 2011. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science* 332: 1097–1100.
- Meyer RS, Purugganan MD. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics* 14: 840–852.
- Micallef SA, Channer S, Shiaris MP, Colón-Carmona A. 2009. Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. *Plant Signaling & Behavior* 4: 777–780.
- Mitter B, Petric A, Chain PS, Trognitz F, Nowak J, Compant S, Sessitsch A. 2013. Genome Analysis, Ecology, and Plant Growth Promotion of the Endophyte *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. In: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Ltd, 865–874.
- Mitter B, Pfaffenbichler N, Flavell R, Compant S, Antonielli L, Petric A, Berninger T, Naveed M, Sheibani-Tezerji R, von Maltzahn G, *et al.* 2017. A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Monier J-M, Lindow SE. 2004. Frequency, Size, and Localization of Bacterial Aggregates on Bean Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 346–355.
- Monier J-M, Lindow SE. 2005. Aggregates of Resident Bacteria Facilitate Survival of Immigrant Bacteria on Leaf Surfaces. *Microbial Ecology* 49: 343–352.





- Moran NA, Sloan DB. 2015. The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLOS Biology* 13: e1002311.
- Morella NM, Weng FC-H, Joubert PM, Metcalf CJE, Lindow S, Koskella B. 2020. Successive passaging of a plant-associated microbiome reveals robust habitat and host genotype-dependent selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117: 1148–1159.
- Morris CE, Kinkel LL. 2002. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields. In: *Phyllosphere microbiology*. St. Paul, Minn: APS Press, 365–375.
- Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffière A, Yan S, Dominguez H, Thompson BM. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal* 2: 321–334.
- Moss EL, Maghini DG, Bhatt AS. 2020. Complete, closed bacterial genomes from microbiomes using nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 38: 701–707.
- Nagel M, Kranner I, Neumann K, Rolletschek H, Seal CE, Colville L, Fernández-Marín B, Börner A. 2015. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley: Genetic and biochemical markers of seed ageing. *Plant, Cell & Environment* 38: 1011–1022.
- Nagel M, Rosenhauer M, Willner E, Snowdon RJ, Friedt W, Börner A. 2011. Seed longevity in oilseed rape (*Brassica napus* L.) – genetic variation and QTL mapping. *Plant Genetic Resources* 9: 260–263.
- Nelson EB. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42: 271–309.
- Nelson EB. 2018. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil* 422: 7–34.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, O'Neill SP, Bilinski TM, Stanish LF, Knelman JE, Darcy JL, Lynch RC, Wickey P, *et al.* 2013. Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR* 77: 342–356.
- Newcombe G, Harding A, Ridout M, Busby PE. 2018. A Hypothetical Bottleneck in the Plant Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Niu B, Paulson JN, Zheng X, Kolter R. 2017. Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E2450–E2459.
- Normander B, Prosser JI. 2000. Bacterial Origin and Community Composition in the Barley Phytosphere as a Function of Habitat and Presowing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4372–4377.



- Oberhardt MA, Zarecki R, Gronow S, Lang E, Klenk H-P, Gophna U, Ruppin E. 2015. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism–media pairings. *Nature Communications* 6: 8493.
- Ofek M, Hadar Y, Minz D. 2011. Colonization of cucumber seeds by bacteria during germination. *Environmental Microbiology* 13: 2794–2807.
- OGTR. 2011. The Biology of *Brassica napus* L. (canola) v2.1. *Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, Australia*: 63.
- Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Simpson G, Solymos P, Stevens M, Wagner H. 2017. Vegan: community ecology package. R package version 2.4-2.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321–326.
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. 1986. Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology* 40: 337–365.
- Opstal EJ van, Bordenstein SR. 2015. Rethinking heritability of the microbiome. *Science* 349: 1172–1173.
- Palmero D, Rodríguez JM, de Cara M, Camacho F, Iglesias C, Tello JC. 2011. Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from atmospheric dust and rainfall dust. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 13–20.
- Panke-Buisse K, Poole AC, Goodrich JK, Ley RE, Kao-Kniffin J. 2015. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *The ISME Journal* 9: 980–989.
- Pannecouque J, Höfte M. 2009. Detection of rDNA ITS polymorphism in *Rhizoctonia solani* AG 2-1 isolates. *Mycologia* 101: 26–33.
- Panpatte DG, Jhala YK, Shelat HN, Vyas RV. 2016. *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. In: Singh DP, Singh HB, Prabha R, eds. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity. New Delhi: Springer India*, 257–270.
- Papke RT, Gogarten JP. 2012. How Bacterial Lineages Emerge. *Science* 336: 45–46.
- Parnell JJ, Berka R, Young HA, Sturino JM, Kang Y, Barnhart DM, DiLeo MV. 2016. From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Patanita M, Campos MD, Félix M do R, Carvalho M, Brito I. 2020. Effect of Tillage System and Cover Crop on Maize Mycorrhization and Presence of *Magnaportheopsis maydis*. *Biology* 9.



- Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE. 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 6548–6553.
- Pérez-Jaramillo JE, Carrión VJ, Bosse M, Ferrão LFV, de Hollander M, Garcia AAF, Ramírez CA, Mendes R, Raaijmakers JM. 2017. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *The ISME Journal* 11: 2244–2257.
- Pielou EC. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* 13: 131–144.
- Pinto D, Santos MA, Chambel L. 2015. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology* 41: 61–76.
- Pinto-Carbó M, Gademann K, Eberl L, Carlier A. 2018. Leaf nodule symbiosis: function and transmission of obligate bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 44: 23–31.
- Pochon S, Simoneau P, Pigné S, Balidas S, Bataillé-Simoneau N, Campion C, Jaspard E, Calmes B, Hamon B, Berruyer R, *et al.* 2013. Dehydrin-like Proteins in the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola* Have a Role in Plant Pathogenesis and Stress Response. *PLOS ONE* 8: e75143.
- Pochon S, Terrasson E, Guillemette T, Iacomi-Vasilescu B, Georgeault S, Juchaux M, Berruyer R, Debeaujon I, Simoneau P, Campion C. 2012. The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant Methods* 8: 16.
- Postma J, Schilder MT, Bloem J, van Leeuwen-Haagsma WK. 2008. Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2394–2406.
- Prado A, Marolleau B, Vaissière BE, Barret M, Torres-Cortes G. 2020. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Scientific Reports* 10.
- Prescott SL. 2017. History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Human Microbiome Journal* 4: 24–25.
- Proctor M, Yeo P. 1973. The pollination of flowers. *The pollination of flowers*.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35: 7188–7196.
- Raaijmakers JM, Mazzola M. 2016. Soil immune responses. *Science* 352: 1392–1393.
- Rader R, Cunningham SA, Howlett BG, Inouye DW. 2020. Non-Bee Insects as Visitors and Pollinators of Crops: Biology, Ecology, and Management. *Annual Review of Entomology* 65: 391–407.



- Ramarathnam R, Fernando WGD. 2006. Preliminary phenotypic and molecular screening for potential bacterial biocontrol agents of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of canola. *Biocontrol Science and Technology* 16: 567–582.
- Rask L, Andréasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* 42: 93–114.
- Reinhold-Hurek B, Bünger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T. 2015. Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annual Review of Phytopathology* 53: 403–424.
- Rezki S, Champion C, Iacomi-Vasilescu B, Preveaux A, Toualbia Y, Bonneau S, Briand M, Laurent E, Hunault G, Simoneau P, *et al.* 2016. Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *PeerJ* 4: e1923.
- Rezki S, Champion C, Simoneau P, Jacques M-A, Shade A, Barret M. 2018. Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil* 422: 67–79.
- Ridout ME, Schroeder KL, Hunter SS, Styer J, Newcombe G. 2019. Priority effects of wheat seed endophytes on a rhizosphere symbiosis. *Symbiosis* 78: 19–31.
- Rillig MC, Antonovics J, Caruso T, Lehmann A, Powell JR, Veresoglou SD, Verbruggen E. 2015. Interchange of entire communities: microbial community coalescence. *Trends in Ecology & Evolution* 30: 470–476.
- Rillig MC, Lehmann A, Aguilar-Trigueros CA, Antonovics J, Caruso T, Hempel S, Lehmann J, Valyi K, Verbruggen E, Veresoglou SD, *et al.* 2016. Soil microbes and community coalescence. *Pedobiologia* 59: 37–40.
- Rini CR, Sulochana KK. 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. *Journal of Tropical Agriculture*: 8.
- Ritpitakphong U, Falquet L, Vimoltust A, Berger A, Métraux J-P, L'Haridon F. 2016. The microbiome of the leaf surface of *Arabidopsis* protects against a fungal pathogen. *The New Phytologist* 210: 1033–1043.
- Rocca JD, Simonin M, Bernhardt ES, Washburne AD, Wright JP. 2020. Rare microbial taxa emerge when communities collide: freshwater and marine microbiome responses to experimental mixing. *Ecology* 101: e02956.
- Rocha I, Ma Y, Souza-Alonso P, Vosátka M, Freitas H, Oliveira RS. 2019. Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops. *Frontiers in Plant Science* 10.
- Rocheffort A, Briand M, Marais C, Wagner M-H, Laperche A, Vallée P, Barret M, Sarniguet A. 2019. Influence of Environment and Host Plant Genotype on the Structure and Diversity of the *Brassica napus* Seed Microbiota. *Phytobiomes Journal* 3: 326–336.





- Rodrigues Pereira AS, Houwen PJW, Deurenberg-Vos HWJ, Pey EBF. 1972. Cytokinins and the bacterial symbiosis of *Ardisia* species. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 68: 170–177.
- Rodríguez CE, Antonielli L, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A. 2019. Heritability and Functional Importance of the *Setaria viridis* Bacterial Seed Microbiome. *Phytobiomes Journal*: PBIOMES-04-19-0023-R.
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* 1: 283–290.
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 243: 1–10.
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6.
- Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews. Immunology* 9: 313–323.
- Rybakova D, Mancinelli R, Wikström M, Birch-Jensen A-S, Postma J, Ehlers R-U, Goertz S, Berg G. 2017. The structure of the *Brassica napus* seed microbiome is cultivar-dependent and affects the interactions of symbionts and pathogens. *Microbiome* 5.
- Saikia R, Kumar R, Arora DK, Gogoi DK, Azad P. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctonia solani*: production of salicylic acid and peroxidases. *Folia Microbiologica* 51: 375–380.
- Saikkonen K, Ion D, Gyllenberg M. 2002. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 269: 1397–1403.
- Saleem M, Law AD, Moe LA. 2016. *Nicotiana* Roots Recruit Rare Rhizosphere Taxa as Major Root-Inhabiting Microbes. *Microbial Ecology* 71: 469–472.
- Sánchez-López AS, Pintelon I, Stevens V, Imperato V, Timmermans J-P, González-Chávez C, Carrillo-González R, Van Hamme J, Vangronsveld J, Thijs S. 2018. Seed Endophyte Microbiome of *Crotalaria pumila* Unpeeled: Identification of Plant-Beneficial Methylobacteria. *International Journal of Molecular Sciences* 19.
- Sanguin H, Kroneisen L, Gazengel K, Kyselková M, Remenant B, Prigent-Combaret C, Grundmann GL, Sarniguet A, Moënne-Loccoz Y. 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, Sarniguet A, Gazengel K, Moënne-Loccoz Y, Grundmann GL. 2009. Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytologist* 184: 694–707.



- Santhanam R, Luu VT, Weinhold A, Goldberg J, Oh Y, Baldwin IT. 2015. Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: E5013–E5020.
- Santoro AE. 2016. The do-it-all nitrifier. *Science* 351: 342–343.
- Sapp J. 1994. Evolution by Association: A History of Symbiosis. *Oxford University Press*.
- Scheunert C. 1920. Über Knochenweiche bei Pferden und 'Dysbiose der Darmflora.' *Z Infekt* 21: 105–121.
- Schirawski J, Perlin MH. 2018. Plant–Microbe Interaction 2017—The Good, the Bad and the Diverse. *International Journal of Molecular Sciences* 19.
- Schlaeppli K, Dombrowski N, Oter RG, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. 2014. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 585–592.
- Schliep KP. 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27: 592–593.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241–6246.
- Sedlazeck FJ, Lee H, Darby CA, Schatz MC. 2018. Piercing the dark matter: bioinformatics of long-range sequencing and mapping. *Nature Reviews Genetics* 19: 329–346.
- Seema M, Punith B, Devaki N. 2012. A simple and rapid nuclear staining method for *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Biotechnic & Histochemistry* 87: 169–171.
- Selosse M-A, Durrieu G. 2004. Une classification mycologique phylogénétique francophone (en 2003). *Acta Botanica Gallica* 151: 73–102.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, *et al.* 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1187–1192.
- Sessitsch A, Pfaffenbichler N, Mitter B. 2019. Microbiome Applications from Lab to Field: Facing Complexity. *Trends in Plant Science* 24: 194–198.
- Shade A, Jacques M-A, Barret M. 2017. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology* 37: 15–22.
- Shade A, Jones SE, Caporaso JG, Handelsman J, Knight R, Fierer N, Gilbert JA. 2014. Conditionally Rare Taxa Disproportionately Contribute to Temporal Changes in Microbial Diversity. *mBio* 5.
- Shade A, McManus PS, Handelsman J. 2013. Unexpected Diversity during Community Succession in the Apple Flower Microbiome. *mBio* 4.



- Shakya M, Lo C-C, Chain PSG. 2019. Advances and Challenges in Metatranscriptomic Analysis. *Frontiers in Genetics* 10.
- Shannon C, Weaver W. 1948. The Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27: 379–423.
- Shelake RM, Pramanik D, Kim J-Y. 2019. Exploration of Plant-Microbe Interactions for Sustainable Agriculture in CRISPR Era. *Microorganisms* 7: 269.
- Sheng X-F, Xia J-J, Jiang C-Y, He L-Y, Qian M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* 156: 1164–1170.
- Shenton M, Iwamoto C, Kurata N, Ikeo K. 2016. Effect of Wild and Cultivated Rice Genotypes on Rhizosphere Bacterial Community Composition. *Rice* 9.
- Shmida A, Wilson MV. 1985. Biological Determinants of Species Diversity. *Journal of Biogeography* 12: 1.
- Simpson EH. 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163: 688–688.
- Singh D, Mathur SB. 2004. Histopathology of Seed-Borne Infections (D Singh and SB Mathur, Eds.). *CRC Press*.
- Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. 2017. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology* 15: 630–638.
- de Souza RSC, Armanhi JSL, Damasceno N de B, Imperial J, Arruda P. 2019. Genome Sequences of a Plant Beneficial Synthetic Bacterial Community Reveal Genetic Features for Successful Plant Colonization. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Spinelli F, Ciampolini F, Cresti M, Geider K, Costa G. 2005. Influence of Stigmatic Morphology on Flower Colonization by *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans*. *European Journal of Plant Pathology* 113: 395–405.
- Sprockett D, Fukami T, Relman DA. 2018. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 15: 197–205.
- Sprunck S. 2020. Twice the fun, double the trouble: gamete interactions in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 53: 106–116.
- Stone BWG, Weingarten EA, Jackson CR. 2018. The Role of the Phyllosphere Microbiome in Plant Health and Function. In: Annual Plant Reviews online. American Cancer Society, 533–556.
- Sturrock CJ, Woodhall J, Brown M, Walker C, Mooney SJ, Ray RV. 2015. Effects of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-1 on roots of wheat and oil seed rape quantified using X-ray Computed Tomography and real-time PCR. *Frontiers in Plant Science* 6.



- Sun X, Shantharaj D, Kang X, Ni M. 2010. Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 611–620.
- Tabrett A, Horton MW. 2020. The influence of host genetics on the microbiome. *F1000Research* 9.
- Tan H, Barret M, Rice O, Dowling DN, Burke J, Morrissey JP, Gara F O. 2012. Long-term agrichemical use leads to alterations in bacterial community diversity. *Plant, Soil and Environment* 58: 452–458.
- Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J. 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell* 7: 573–588.
- Tesson SVM, Okamura B, Dudaniec RY, Vyverman W, Löndahl J, Rushing C, Valentini A, Green AJ. 2015. Integrating microorganism and macroorganism dispersal: modes, techniques and challenges with particular focus on co-dispersal. *Écoscience* 22: 109–124.
- Tewoldemedhin YT, Lamprecht SC, McLeod A, Mazzola M. 2006. Characterization of *Rhizoctonia* spp. Recovered from Crop Plants Used in Rotational Cropping Systems in the Western Cape Province of South Africa. *Plant Disease* 90: 1399–1406.
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, Bosch TCG, Cryan JF, Gilbert SF, Goodnight CJ, Lloyd EA, *et al.* 2016. Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* 1.
- Thiergart T, Durán P, Ellis T, Vannier N, Garrido-Oter R, Kemen E, Roux F, Alonso-Blanco C, Ågren J, Schulze-Lefert P, *et al.* 2020. Root microbiota assembly and adaptive differentiation among European *Arabidopsis* populations. *Nature Ecology & Evolution* 4: 122–131.
- Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ, McQuilken MP, Purdy KJ, Rainey PB, *et al.* 1993. Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil* 150: 177–191.
- Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* 474: 1823–1836.
- Tian Y, Zhao Y, Wu X, Liu F, Hu B, Walcott RR. 2015. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon: T6SS contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Molecular Plant Pathology* 16: 38–47.
- Tikhonov M. 2016. Community-level cohesion without cooperation (CT Bergstrom, Ed.). *eLife* 5: e15747.
- Toju H, Abe MS, Ishii C, Hori Y, Fujita H, Fukuda S. 2020. Scoring Species for Synthetic Community Design: Network Analyses of Functional Core Microbiomes. *Frontiers in Microbiology* 11.





- Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S, Onoda Y, *et al.* 2018. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants* 4: 247–257.
- Torres-Cortés G, Bonneau S, Bouchez O, Genthon C, Briand M, Jacques M-A, Barret M. 2018. Functional Microbial Features Driving Community Assembly During Seed Germination and Emergence. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Tripathi MK, Mishra AS. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* 132: 1–27.
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J. 2015. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports* 7: 40–50.
- Turner TR, James EK, Poole PS. 2013. The plant microbiome. *Genome Biology* 14: 209.
- Tweddle JC, Dickie JB, Baskin CC, Baskin JM. 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology* 91: 294–304.
- Tyler HL. 2019. Bacterial community composition under long-term reduced tillage and no till management. *Journal of Applied Microbiology* 126: 1797–1807.
- Urbina H, Breed MF, Zhao W, Lakshmi Gurralla K, Andersson SGE, Ågren J, Baldauf S, Rosling A. 2018. Specificity in *Arabidopsis thaliana* recruitment of root fungal communities from soil and rhizosphere. *Fungal Biology* 122: 231–240.
- Uroz S, Courty PE, Oger P. 2019. Plant Symbionts Are Engineers of the Plant-Associated Microbiome. *Trends in Plant Science* 24: 905–916.
- Ushio M, Yamasaki E, Takasu H, Nagano AJ, Fujinaga S, Honjo MN, Ikemoto M, Sakai S, Kudoh H. 2015. Microbial communities on flower surfaces act as signatures of pollinator visitation. *Scientific Reports* 5.
- Vacher C, Hampe A, Porté AJ, Sauer U, Compant S, Morris CE. 2016. The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 47: 1–24.
- Van Acker H, Gielis J, Acke M, Cools F, Cos P, Coenye T. 2016. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Induced Cell Death in Burkholderia cepacia Complex Bacteria. *PLoS ONE* 11.
- Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Van AL, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 206: 1196–1206.
- Vannier N, Agler M, Hacquard S. 2019. Microbiota-mediated disease resistance in plants (C Zipfel, Ed.). *PLoS Pathogens* 15: e1007740.
- Vannier N, Mony C, Bittebiere A-K, Michon-Coudouel S, Biget M, Vandenkoornhuyse P. 2018. A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome* 6: 79.



- Vázquez-de-Aldana BR, García-Ciudad A, García-Criado B, Vicente-Tavera S, Zabalgoceazcoa I. 2013. Fungal Endophyte (*Epichloë festucae*) Alters the Nutrient Content of *Festuca rubra* Regardless of Water Availability. *PLOS ONE* 8: e84539.
- Vellend M. 2010. Conceptual Synthesis in Community Ecology. *The Quarterly Review of Biology* 85: 183–206.
- Venterea RT, Rolston DE. 2000. Nitric and nitrous oxide emissions following fertilizer application to agricultural soil: Biotic and abiotic mechanisms and kinetics. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 105: 15117–15129.
- Verma SK, Kingsley K, Irizarry I, Bergen M, Kharwar RN, White JF. 2017. Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *Journal of Applied Microbiology* 122: 1680–1691.
- Větrovský T, Baldrian P. 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE* 8.
- Vorholt JA. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 10: 828–840.
- Vorholt JA, Vogel C, Carlström CI, Müller DB. 2017. Establishing Causality: Opportunities of Synthetic Communities for Plant Microbiome Research. *Cell Host & Microbe* 22: 142–155.
- Wagner MR, Lundberg DS, del Rio TG, Tringe SG, Dangl JL, Mitchell-Olds T. 2016. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications* 7: 12151.
- Walitang DI, Kim C-G, Kim K, Kang Y, Kim YK, Sa T. 2018. The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. *BMC Plant Biology* 18: 51.
- Wallace JG, Kremling KA, Kovar LL, Buckler ES. 2018. Quantitative Genetics of the Maize Leaf Microbiome. *Phytobiomes Journal* 2: 208–224.
- Walters C, Berjak P, Pammenter N, Kennedy K, Raven P. 2013. Preservation of Recalcitrant Seeds. *Science* 339: 915–916.
- Walters WA, Jin Z, Youngblut N, Wallace JG, Sutter J, Zhang W, González-Peña A, Peiffer J, Koren O, Shi Q, *et al.* 2018. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 7368–7373.
- Wang Z, Cao Y, Zhu-Barker X, Nicol GW, Wright AL, Jia Z, Jiang X. 2019a. *Comammox Nitrospira* clade B contributes to nitrification in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 135: 392–395.
- Wang J-W, Kuo C-H, Kuo F-C, Wang Y-K, Hsu W-H, Yu F-J, Hu H-M, Hsu P-I, Wang J-Y, Wu D-C. 2019b. Fecal microbiota transplantation: Review and update. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi* 118 Suppl 1: S23–S31.



- Wei Z, Yang T, Friman V-P, Xu Y, Shen Q, Jousset A. 2015. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nature Communications* 6.
- Whipps JM, Lewis K, Cooke RC. 1988. Mycoparasitism and plant disease control. *Fungi in biological control systems*: 161–187.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols. San Diego: Academic Press, 315–322.
- Widder S, Allen RJ, Pfeiffer T, Curtis TP, Wiuf C, Sloan WT, Cordero OX, Brown SP, Momeni B, Shou W, *et al.* 2016. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal* 10: 2557–2568.
- Wilkinson DM, Koumoutsaris S, Mitchell EAD, Bey I. 2012. Modelling the effect of size on the aerial dispersal of microorganisms. *Journal of Biogeography* 39: 89–97.
- Wilkinson DM, Sherratt TN. 2001. Horizontally acquired mutualisms, an unsolved problem in ecology? *Oikos* 92: 377–384.
- Wit RD, Bouvier T. 2006. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology* 8: 755–758.
- Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5088–5090.
- Wright E S. 2016. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal* 8: 352.
- Wulff EG, Mguni CM, Mansfeld-Giese K, Fels J, Lübeck M, Hockenhull J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51: 574–584.
- Yadav M, Patil M, Naik M, Sunkad G, Nagaraj B, Devanna P, Patil N. 2019. Morphological, genetic and virulence diversity of *Rhizoctonia solani* isolates from different rice growing regions of Southern India. *Research journal of biotechnology* 14: 16–24.
- Yamamoto S, Harayama S. 1996. Phylogenetic Analysis of *Acinetobacter* Strains Based on the Nucleotide Sequences of *gyrB* Genes and on the Amino Acid Sequences of Their Products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46: 506–511.
- Yang L, Danzberger J, Schöler A, Schröder P, Schloter M, Radl V. 2017. Dominant Groups of Potentially Active Bacteria Shared by Barley Seeds become Less Abundant in Root Associated Microbiome. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Yang J, Verma PR, Tewari JP. 1992. Histopathology of resistant mustard and susceptible canola hypocotyls infected by *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research* 96: 171–179.



- Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton-Marcell J, Lax S, Bokulich NA, Mills DA, Martin G, Taghavi S, *et al.* 2015. The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *mBio* 6.
- Zélé F, Magalhães S, Kéfi S, Duncan AB. 2018. Ecology and evolution of facilitation among symbionts. *Nature Communications* 9: 4869.
- Zhang J, Zhang C, Yang J, Zhang R, Gao J, Zhao X, Zhao J, Zhao D, Zhang X. 2019. Insights into Endophytic Bacterial Community Structures of Seeds Among Various *Oryza sativa* L. Rice Genotypes. *Journal of Plant Growth Regulation* 38: 93–102.
- Zhang Q, Zhang J, Yang L, Zhang L, Jiang D, Chen W, Li G. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control* 72: 98–108.

**Titre :** Le microbiote des graines de *Brassica napus* : assemblage, transmission et contribution à la réponse de la plante à un champignon pathogène du sol

**Mots clés :** microbiote des graines, sol, coalescence, communautés synthétiques, culturomique, maladie fongique

**Résumé :** Le microbiote des plantes peut moduler leur fitness. Comprendre les processus écologiques qui dirigent son assemblage est nécessaire pour promouvoir la croissance et la santé des plantes via la manipulation de sa composition. La graine et le sol sont les deux principaux réservoirs du microbiote de la plante et donc essentiels pour son assemblage. Dans cette thèse, nous avons montré que la structure du microbiote des graines de *Brassica napus* est surtout façonnée par l'environnement mais également par le génotype de l'hôte. Le produit de la coalescence des communautés des graines et du sol a été évalué avec des sols de diversité microbienne contrastée et des lots de graines distincts. Seule la diversité microbienne du sol module la structure du microbiote des racines et des tiges.

Les plantules favorisent l'émergence de taxons rares issus des graines et du sol. L'influence de ces niveaux de diversité sur une maladie a été mesurée avec le champignon pathogène *Rhizoctonia solani*. Le sol de diversité élevée entraîne une réduction de maladie pour un lot de graines, révélant un rôle du microbiote des graines. Aucun lien entre le microbiote des graines, le microbiote des plantules et la maladie n'a pu être établi. La transmission de communautés synthétiques bactériennes a ensuite été mesurée. Leur inoculation sur graines impacte la diversité du microbiote des plantules et la maladie. La connaissance de la coalescence, la transmission de taxons rares et l'utilisation de communautés synthétiques révèlent de nouveaux leviers de pilotage de l'assemblage du microbiote des plantules et la réduction de maladie.

**Title:** The *Brassica napus* seed microbiota: assemblage, transmission and contribution to plant response to a soilborne fungal pathogen

**Keywords:** seed microbiota, soil microbiota, coalescence, synthetic communities, culturomics, fungal disease

**Abstract:** Plant microbiota can modulate host fitness. Understanding the ecological processes that drive its assembly is a prerequisite for promoting plant growth and health via the manipulation of its composition. Seed and soil are two main sources of plant microbiota inoculum and are therefore critical for its assembly. In this thesis, we showed that the structure of the seed microbiota of *Brassica napus* is primarily shaped by the environment and to a lesser extent by host genotype. The output of community coalescence between seed and soil microbiota was assessed with soils of contrasting microbial diversity and with distinct seed samples. Soil diversity but not seed diversity modulates seedling microbiota structure in roots and stems.

Overall, seedling favors the emergence of seed- and soil-borne rare taxa. Impact of these different levels of initial diversity on a plant disease were monitored during inoculation with the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. The soil of high diversity promotes disease reduction for one particular seed lot, giving rise for a role of the seed microbiota. No link between initial seed microbiota, seedling microbiota and disease could be established. The transmission of bacterial synthetic communities was subsequently monitored. Their inoculation on seed influences seedling microbial diversity and disease. Coalescence knowledge, transmission of rare taxa from seed to seedling and synthetic community using, give new inputs to drive seedling microbiota assembly and disease reduction.