



**HAL**  
open science

# Décryptage des processus d'assemblage du microbiote des graines dans le but de limiter la transmission d'agents pathogènes

Guillaume Chesneau

► **To cite this version:**

Guillaume Chesneau. Décryptage des processus d'assemblage du microbiote des graines dans le but de limiter la transmission d'agents pathogènes. Microbiologie et Parasitologie. Université d'Angers, 2021. Français. NNT : 2021ANGE0047 . tel-03678713

**HAL Id: tel-03678713**

**<https://theses.hal.science/tel-03678713>**

Submitted on 25 May 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par

**Guillaume CHESNEAU**

**Décryptage des processus d'assemblage du microbiote des graines  
dans le but de limiter la transmission d'agents pathogènes**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 09 décembre 2021

Unité de recherche : IRHS1345 Equipe EmerSys

Thèse N° : **(10)**

## Rapporteurs avant soutenance :

Alia DELLAGI                      Professeure – AgroParisTech, UMR IJPB  
Manuel BLOUIN                  Professeur - AgroSup, UMR Agroécologie

## Composition du Jury :

Président :

Examineurs :

Thomas GUILLEMETTE  
Aurélié DEVEAU  
Stéphane HACQUARD

Professeur – Université Angers, UMR IRHS  
Chargée de recherche – INRAE, UMR IAM  
Chargé de recherche – MPIPZ

Dir. de thèse :

Marie-Agnès JACQUES

Directrice de recherche – INRAE, UMR IRHS

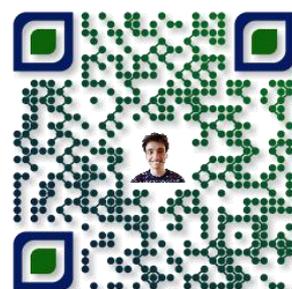
Co-dir. de thèse :

Matthieu BARRET

Chargé de recherche – INRAE, UMR IRHS



*"Yo, Adrian! I did it" (Rocky, Rocky, 1976)*





# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	I
<b>Liste des abréviations</b> .....	V
<b>Liste des figures</b> .....	VIII
<b>Liste des tableaux</b> .....	XI
<b>Liste des articles</b> .....	XII
<b>CONTEXTE GENERAL</b> .....	1
<b>I. Contexte scientifique</b> .....	2
<b>II. Structure de la thèse</b> .....	5
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	7
<b>I. La graine</b> .....	8
a. Structure et formation de la graine mature.....	8
i. Terminologie autour de la graine .....	8
ii. La pollinisation .....	9
iii. La fécondation et le développement de la graine.....	10
b. Enjeux autour des semences .....	12
c. Les agents pathogènes transmissibles par les semences .....	13
d. La lutte contre les agents phytopathogènes transmissibles par les semences .....	14
<b>II. Le microbiote des plantes</b> .....	18
a. Composition du microbiote .....	18
i. Variation spatiale .....	18
ii. Variation temporelle .....	20
iii. Variation au niveau de l'espèce végétale .....	21
b. Impact du microbiote sur la croissance et la santé des plantes.....	22
<b>III. Assemblage du microbiote des plantes</b> .....	25



a.	Sources d'inoculum des plantes .....	25
b.	Processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote.....	26
i.	Dispersion.....	27
ii.	Diversification .....	28
iii.	Dérive écologique .....	29
iv.	Sélection.....	29
c.	Interactions inter-microbiennes.....	31
i.	Compétition par interférence.....	31
ii.	Compétition par exploitation des ressources.....	33
d.	La sélection par l'hôte .....	34
<b>IV.</b>	<b>Transmission du microbiote à et par la graine .....</b>	<b>37</b>
a.	De la plante-mère à la graine.....	38
i.	Transmission par la voie interne .....	39
ii.	Transmission par la voie florale.....	39
iii.	Transmission par la voie externe.....	40
b.	De la graine à la plantule.....	41
<b>V.</b>	<b>Pilotage du microbiote des graines.....</b>	<b>43</b>
a.	La biostimulation .....	43
b.	Le biocontrôle .....	44
<b>VI.</b>	<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>47</b>
<b>CHAPITRE 1 :</b>	<b>Assemblage du microbiote pendant le développement de la graine .....</b>	<b>48</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>49</b>
a.	Contexte .....	49
b.	Objectifs et stratégies.....	49
c.	Contribution des auteurs à ce travail .....	50



<b>II. Résultats</b> .....	51
<b>III. Conclusion</b> .....	85
<b>CHAPITRE 2 : Assemblage du microbiote de la graine individuelle de la plante mère à la plantule</b> .....	87
<b>I. Introduction</b> .....	88
a. Contexte .....	88
b. Objectifs et stratégies.....	89
c. Contribution des auteurs à ce travail .....	90
<b>II. Résultats</b> .....	91
<b>III. Conclusion</b> .....	145
<b>CHAPITRE 3 : Analyse des déterminants bactériens et des défenses des plantes impliqués dans la colonisation de la plantule</b> .....	147
<b>I. Introduction</b> .....	148
a. Contexte .....	148
b. Objectifs et stratégies.....	149
c. Contribution des auteurs à ce travail .....	149
<b>II. Résultats</b> .....	150
<b>III. Conclusion</b> .....	171
<b>CHAPITRE 4 : Limitation de l'incidence de l'agent pathogène <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> sur les semences</b> .....	172
<b>I. Introduction</b> .....	173
a. Contexte .....	173
b. Objectifs et stratégies.....	173
c. Contributions des auteurs.....	174
<b>II. Résultats</b> .....	175
<b>III. Conclusion</b> .....	205



DISCUSSION / PERSPECTIVES ..... 206

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 215



# Remerciements

---

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse : **Manuel BLOUIN**, **Alia DELLAGI**, **Aurélié DEVEAU**, **Thomas GUILLEMETTE** et **Stéphane HACQUARD**, qui ont accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mon travail. Je tiens également à remercier les membres de mon comité avec qui j'ai pu interagir tout au long de ma thèse et qui ont chacun apporté leur pièce à ce projet, merci donc à **Alice BOULANGER**, **Béatrice LAROCHE** et **Jérôme VERDIER**.

Eh bien voilà c'est fini, 3 années de thèse, ça passe vite mais franchement c'est cool. Une thèse c'est beaucoup de travail, c'est beaucoup d'enseignements, mais c'est aussi beaucoup de bons moments. Et tout ça a été possible grâce à chaque personne citée dans ces remerciements.

Je ne peux commencer ces remerciements que par mes encadrants. **Mathieu**, un grand merci à toi, cette thèse c'est avant tout grâce à toi qu'elle a été possible et qu'elle a pu être menée à bien. Un grand merci pour toute ton aide, tes conseils, ta disponibilité et ta bienveillance. J'ai adoré tout ce que j'ai pu faire et réaliser pendant ces trois années de thèse, et ça n'a fait qu'aiguiser mon envie de continuer à travailler dans la recherche. Un grand merci également pour ta bonne humeur et tes blagues. C'est pour moi, tout aussi important que le reste. J'ai d'innombrables souvenirs de bons moments passés au labo durant cette thèse et c'est en partie grâce à toi. Un grand merci également à toi **Marie-Agnès**, tu m'as énormément appris dans la recherche, tu es d'un soutien sans faille, bienveillante et toujours de bons conseils. Tu as une bonne humeur et une énergie communicative, qui sont essentielles pour affronter sereinement une thèse. Un grand merci pour tout ça et pour tous les bons moments qui ont rythmé mes 3 années de thèse. Voilà, il est temps pour moi de laisser ma place à mes successeurs doctorants, c'est vraiment une chance de pouvoir travailler dans un environnement aussi agréable au cours d'une thèse. Encore un grand merci à tous les deux.

Je souhaite remercier ensuite, certainement ma plus belle rencontre au cours de ces trois années de thèse, on est arrivé presque en même temps au sein de l'équipe EmerSys. Merci **Coralie**, pour ce que tu m'as apporté d'un point de vue aussi bien professionnel que personnel. Tu fais partie intégrante de ce manuscrit que tu as attentivement et intensément relu :). Tu as été présente sur tous les projets que j'ai réalisés au cours de cette thèse. On a séquencé des reads et des reads, avec pas moins de 8 runs de séquençage Illumina à notre actif qui ont donné les



résultats présentés ici. Au-delà de ça, tu as toujours été de très bon conseil et indispensable dans ma vie « parfois » mal-organisée de doctorant. Maintenant que je pars je te cède avec joie ma paillasse du labo 217, prends en soin ;). J'en profite pour placer ici un énorme merci à **Mathieu**, on a passé tous les trois des moments inoubliables pendant cette dernière année et vous avez été des piliers de soutien, de joie (et de bar) pendant cette thèse. Aucune crainte sur le fait qu'on se reverra, vous êtes exceptionnels.

Un immense merci également à **Anne**, j'ai appris la microbiologie à tes côtés. Il est impossible de calculer le nombre de boîtes que nous avons étalé ensemble, le nombre de plantules que l'on a mis dans des tubes en verre, ou encore le nombre de DO que l'on a pu mesurer. Sans toi, j'aurais passé des nuits dans le laboratoire, un grand merci pour toute ton aide qui m'a été indispensable tout au long de ma thèse. Le labo de quarantaine va définitivement perdre son meilleur binôme ! Au-delà de tout ça, j'ai énormément apprécié travailler, discuter et rire avec toi pendant ces trois années de thèse. C'est avec plaisir que je passerai te voir quand je reviendrai à Angers.

Je souhaite également remercier chaleureusement, **Marie** et **Alain**, vous faites partie des personnes qui donnent envie de faire de la recherche. Vous m'avez donné énormément de bons conseils tout au long de ma thèse et vous avez toujours été ouverts à la discussion à n'importe quel moment. Vous apportez énormément d'ondes positives, j'ai adoré discuter avec vous à chaque instant, que ce soit de sciences ou d'autres sujets.

Je remercie également toute l'équipe EmerSys. J'ai vraiment passé de supers bons moments avec vous tous. Merci à **Armelle**, tu as toujours été de bon conseil, et tu m'as beaucoup aidé dans toutes mes expériences de transmission. Au-delà de tout ça, tu es une super collègue de bureau. Je pense qu'on a su représenter la Mayenne comme il se doit, c'est à toi seule que revient maintenant le devoir de la défendre. Merci à **Martial**, pour toutes nos discussions, ta bonne humeur, et tes conseils, ainsi que pour tout le temps que tu m'as fait gagner sur mes analyses bioinfo, c'est incalculable. Mais en plus de la bioinfo, tu es vraiment fort au ping-pong et au foot, et ça s'est stylé. Merci également à **Sophie B**, pour ton aide sur les mutants et pour nos discussions de couloir ou de labo rarement sérieuses mais des fois un peu quand même. Et tu le sais parce que je ne suis pas discret, mais merci pour tous les milieux de culture que je t'ai emprunté souvent sans te demander :). Merci à tous ceux qui m'ont aidé à récolter des graines de radis ou de haricot pendant ma thèse et vous êtes nombreux. Merci à **Brice, Gloria, Tristan, Perrine, Géraldine, Chrystelle, Agathe, Nico, Audrey, Enora, Marion, Cécile, Sophie C, Alba,**



**Anne-Sophie, Damien, Quentin, Killian, Arthur.** J'ai passé des supers moments avec chacun d'entre vous, et ce sera toujours un plaisir pour moi de vous revoir.

Un grand merci aux anciens doctorants de l'équipe, **Caroline, Enora, Valérian** pour nos discussions et les moments passés ensemble pendant ma thèse. Merci spécial à Justine, plus qu'une doctorante tu es devenue au fil des années une vraie amie, on continuera à se voir même après mon départ ;). Merci également à **Tiffany** et **Charlotte**, je vous souhaite beaucoup de courage pour vos thèses respectives, mais je n'ai aucun doute sur le fait que vous y arriverez, haut les mains :). Merci la pause T de 16h, **Tiffany** et **Coralie** vous avez été des valeurs sûres, cette pause était idéal pour se changer l'esprit et discuter. Bon courage à toi **Gontran**, tu viens tout juste d'arriver mais tu vas faire perdurer les beaux jours du microbiote des semences dans cette équipe, c'est garanti. Merci aussi aux stagiaires que j'ai encadré pour leur implication dans leurs travaux, **Amandine, Dorcas** et **Paul**.

Merci à l'équipe ResPom, j'ai parfois hésité à m'installer un bureau annexe chez vous. Remerciement spécial à **Brice** et à **Anthony**. Vous êtes tous les deux les boss de la RT-qPCR, merci pour tous vos conseils. Mais au-delà de ça, vous êtes vraiment des bons, je n'ai pas compté les moments passés dans votre bureau, un environnement idéal pour passer une thèse. Merci aussi à **Erwan**, on est arrivé ensemble au bâtiment C, on va repartir ensemble. Que des bons moments et des discussions au labo et en dehors passés avec toi, tu es devenu un ami, et on se reverra après ma thèse c'est certain. Un grand merci également à **Raphaël**, mon coach ;). Avec qui 10-14-16-18 kilomètres, qu'il fasse beau, qu'il pleuve ou qu'il vente, n'empêchent pas une course le temps d'une pause déjeuner. La course à pied c'est comme une thèse, c'est intense et c'est dur parfois mais il faut s'avoir s'économiser, car c'est long. Comme a dit un jour le grand Eliud Kipchoge, 2h01min39sec au marathon « De temps en temps, vous pouvez courir très vite, mais vous ne pouvez pas toujours aller au maximum ». Raphaël, je t'attends le 25 septembre 2022 à Berlin pour une petite course ;).

Merci à tous les membres de l'IRHS pour leur aide pendant ma thèse. Merci **Muriel**, pour ton aide précieuse pour le séquençage, 90% des données de cette thèse repose sur le plateau ANAN. Merci à **Daniel** pour t'être occupé de mes radis, haricots et choux pendant toute la durée de ma thèse. Merci à **David** et **Dimitri** du SONAS de votre disponibilité pour les analyses métaboliques. Merci aux collègues d'enseignements, **Tristan** et **Thomas** de m'avoir permis de faire de l'enseignement pendant ma thèse, j'adore la fac, ça a été un réel plaisir à chaque fois pour moi de faire un TP, un TD, ou même de surveiller un examen. Merci aussi à mes collègues de TPs et



TDs, **Justine** et **Julia**, franchement les TPs en parallèle il n’y a rien de mieux, j’ai vraiment adoré travailler avec vous, j’en ai que des bons souvenirs. Merci aux deux représentants des doctorants de la SFR QuaSav, **Alexis** et **Ophélie**. L’organisation de la journée des doctorants a vraiment été une superbe expérience avec chacun d’entre vous.

Outside IRHS, thanks to **Lauren** for your help in the analysis of RB-TnSeq data and our collaborative work during my thesis. Thanks also for the journey in California. That was my first time in USA and that was awesome, maybe a good place for my next post doc! Mais avant ça direction l’Allemagne. Ich danke **Stéphane HACQUARD** herzlich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Forschung am Max-Planck-Institut in Köln zu betreiben. J’ai très hâte de commencer cette nouvelle aventure dans ce labo que je suis avec intérêt depuis le tout début de ma thèse. Au revoir Flamboyant 5, bonjour Arabette.

Merci à toi **Maman**, s’il y a bien une personne qui m’a toujours soutenu c’est bien toi. C’est en grande partie pour ça qu’aujourd’hui j’ai pu faire cette thèse et réussir tout ce que j’ai pu entreprendre. Je n’ai jamais manqué de rien, et c’est toujours avec grand plaisir que je reviens faire des séjours en Mayenne. Un grand merci encore pour tout. Merci également à mon frère, **Bastien** et à **Marita**, pour m’avoir aidé à m’évader l’esprit en dehors de ma thèse pendant mes séjours à Paris, ou pendant les innombrables sessions ronces en Mayenne. Merci à toute ma famille d’Alsace pour votre soutien et votre accueil tous les ans depuis 27 ans, vive les cigognes et la choucroute. Merci à tous mes amis de Mayenne, et de la fac, vous êtes tous des valeurs sûres depuis des années et pour certains d’entre vous depuis toujours. Et je sais que je peux compter sur vous à n’importe quel moment.

Un grand merci aussi à la toute dernière personne arrivée dans ma vie. Une rencontre sur les bords de Maine, qui va se prolonger outre-Rhin. **Nelly** tu as été mon rayon de soleil dans cette dernière année de thèse. J’ai énormément de chance de t’avoir rencontré, maintenant il va falloir laisser place à la belle aventure qui nous attend :).

Je vous souhaite à tous plein de belles choses et je vous dis à bientôt !

**Guillaume**



# Liste des abréviations

---

## -A-

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ANAN** : Analyse des Acides Nucléiques

**ARNr** : Acide RiboNucléique ribosomique

**ASV** : Amplicon sequence variant

## -C-

**CDS** : Codon DNA sequence

**CFBP** : Collection Française de Bactéries Phytopathogènes

**CFP** : Cyan Fluorescent Protein

**CFS** : Culture Free Supernatant

**CFU** : Colony Forming Unit

## -E-

**ETI** : Effector-triggered immunity

**ETS** : Effector-triggered susceptibility

## -F-

**FAO** : Food and Agriculture Organisation

**FC** : Fold Change

**FNAMS** : Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences

## -G-

**GFP** : Green Fluorescent Protein

***gyrB*** : *gyrase B*



**-I-**

**ISF** : International Seed Federation

**ISTA** : International Seed Testing Association

**-K-**

**KWS** : Kammer der Steuerberater und Wirtschaftsprüfer

**-N-**

**NLR** : Nucleotide-binding Lecine-rich Repeat

**-M-**

**MAMP** : Microbe Associated Molecular Pattern

**MTI** : MAMP-triggered immunity

**-P-**

**pH** : potentiel Hydrogène

**PRR** : Plant Recognition Receptor

**-Q-**

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction

**-R-**

**RB-Tnseq** : Random Barcoded Transposon sequencing

**RFO** : Raffinose Family Oligosaccharides

**-S-**

**SFR QUASAV** : Structure Fédératrice de Recherche Qualité et Santé du Végétal

**SOC** : Service Officiel de Contrôle et de certification

**-T-**

**T6SS** : Système de Sécrétion de Type VI



**TSA** : Tryptone de Soja Agar

**TSB** : Tryptone de Soja Broth

**-U-**

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UVC** : UltraViolets classe C

**-X-**

***Xcc*** : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

***Xcf*** : *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*



# Liste des figures

---

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

**Figure 1** : Structures florales impliquées dans la fécondation.

**Figure 2** : Structure d'une graine.

**Figure 3** : Importance relative des trois phases du développement des graines.

**Figure 4** : Principaux événements physiologiques et biochimiques liés au remplissage des graines et à l'acquisition de la longévité pendant la maturation tardive des graines.

**Figure 5** : Liste des organismes nuisibles de référence de l'ISTA.

**Figure 6** : Représentation schématique de l'inoculation des semences.

**Figure 7** : Structure taxonomique des communautés bactériennes et fongiques de diverses niches associées aux plantes.

**Figure 8** : Structure phylogénétique du microbiote végétal.

**Figure 9** : Impact de l'inoculation de *Sphingomonas melonis* ZJ26 sur le phénotype de riz sensible à l'agent pathogène *Burkholderia plantarii* (Bp).

**Figure 10** : Les plantes acquièrent leur microbiote à partir de différentes sources d'inoculum.

**Figure 11** : Un modèle de sélection en deux étapes pour la différenciation du microbiote racinaire.

**Figure 12** : Figure conceptuelle décrivant les influences relatives des processus écologiques

**Figure 13** : Modèle en zig zag.

**Figure 14** : Voies de transmission horizontale et verticale des micro-organismes.

**Figure 15** : Les voies de transmission des micro-organismes aux graines.

**Figure 16** : Impact de la domestication sur les caractéristiques des plantes conduisant à des modifications dans la composition des communautés microbiennes A. Impact de la domestication avant dispersion des semences.



## **CHAPITRE 1 : Assemblage du microbiote pendant le développement de la graine**

---

**Figure 1** : Experimental sampling.

**Figure 2** : Temporal diversity of bacterial communities associated with reproductive organs of common bean and radish.

**Figure 3** : Temporal structure of bacterial communities associated with reproductive organs of common bean and radish.

**Figure 4** : Bacterial taxa dynamics during seed development of common bean.

**Figure 5** : Overall genome relatedness of bacterial strains. Genome sequences of 39 bacterial strains representing the most abundant ASVs were obtained.

## **CHAPITRE 2 : Assemblage du microbiote de la graine individuelle de la plante mère à la plantule**

---

**Figure 1** : Comparison of seed bacterial community profiles before and after culture-enrichment on TSA10.

**Figure 2** : Structure of the bacterial fraction of the seed microbiota.

**Figure 3** : Dominant bacterial taxa within the seed microbiota based on 16S rRNA genes.

**Figure 4** : Origin of seed-borne taxa.

**Figure 5** : Ecological processes involved in seed microbiota assembly.

**Figure 6** : Comparison of seed and seedling microbiota profiles.

**Figure 7** : Seed to seedling transmission.

**Figure 8** : Impact of seed-borne ASVs on bean seedling phenotype.

## **CHAPITRE 3 : Analyse des déterminants bactériens et des défenses des plantes impliqués dans la colonisation de la plantule**

---

**Figure 1** : Experimental protocol.



**Figure 2** : Differential expression of plant defenses in seedling compartments.

**Figure 3** : Relative expression of genes involved in plant defenses.

**Figure 4** : Number of Xcc8004 genetic determinants important for Xcc8004 transmission when competed with seed-borne taxa.

#### **CHAPITRE 4 : Limitation de l'incidence de l'agent pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur les semences**

---

**Figure 1** : Increase of Xcc8004 generation time following supplementation with CFS from Xcc8004-CFBP13502 co-culture.

**Figure 2** : Increase of Xcc8004 generation time following supplementation with CFSs from CFBP13502 co-cultured with each of the 30 seed-borne bacterial strains.

**Figure 3** : Genetic organization of the cluster of genes presenting similarities with pyoverdine biosynthesis genes.

**Figure 4** : Xcc8004 growth inhibition was relieved by FeCl<sub>3</sub> supplementation.

**Figure 5** : Summary of functional behavior of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004) and *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502 leading to the excretion of a Xcc8004 inhibitory compound.

#### **DISCUSSION / PERSPECTIVES**

---

**Figure 1** : Principaux résultats portant sur l'assemblage du microbiote des graines, révélés dans ces travaux de thèse.



# Liste des tableaux

---

## **CHAPITRE 1 : Assemblage du microbiote pendant le développement de la graine**

---

**Table 1** : Orthologous groups specifically associated with genome sequences from bean cluster 2 and bean cluster 4.

## **CHAPITRE 3 : Analyse des déterminants bactériens et des défenses des plantes impliqués dans la colonisation de la plantule**

---

**Table 1** : Xcc8004 genetic determinants important for Xcc8004 transmission from the seed to the seedling.

## **CHAPITRE 4 : Limitation de l'incidence de l'agent pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur les semences**

---

**Table 1** : Bacterial strains used in the study.

**Table 2** : List of Xcc8004 genes involved in lower fitness of the mutant following supplementation with CFS of CFBP13502 and Xcc8004.



# Liste des articles

---

Cette thèse est basée sur les articles suivants. Ces articles sont soit publiés (**Article 1 et 2**), en révision (**Article 2**) ou en préparation (**Article 3 et 4**).

---

**Article 1** : Chesneau, G., Torres-Cortes, G., Briand, M., Darrasse, A., Preveaux, A., Marais, C., ... & Barret, M. (2020). Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(12), fiae190. Doi : <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae190>.

**Article 2** : Chesneau, G., Laroche, B., Préveaux, A., Marais, C., Briand, M., Marolleau, B., ... & Barret, M. (2021). Single seed microbiota: assembly and transmission from parent plant to seedling. *bioRxiv*. Doi : <https://doi.org/10.1101/2021.05.31.446402>. *In revision*.

**Article 3** : Chesneau, G., Lui, L., Boulanger, A., Morgan, P., Marolleau, B., Préveaux, A., ... & Barret, M. Molecular determinants involved in bacterial seedling transmission. *In prep*.

**Article 4** : Chesneau, G., Lui, L., Bréard, D., Boulanger, A., Briand, M., Bonneau, S., ... & Barret, M. Identification of an atypical pyoverdine possessing antimicrobial activity, excreted by *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502 in presence of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* transmission. *In prep*.



# CONTEXTE GENERAL



## I. Contexte scientifique

Les semences constituent le premier maillon de la production agricole et par conséquent, de la chaîne alimentaire. En tant que telles, elles ont une influence déterminante sur les modèles agricoles ainsi que sur la diversité et la qualité des aliments. Les semences représentent donc un matériel végétal de grande valeur économique. Selon MarketsandMarkets (société de conseil), le marché des semences atteint une valeur marchande estimée en 2021 à environ 58 milliards d'euros, et elle va subir un taux de croissance de 6,6 % entre 2021 et 2026. En effet, l'augmentation de la population mondiale ajoutée à la diminution des terres arables disponibles due à l'urbanisation, implique la nécessité d'augmenter drastiquement la production de semences et ainsi les ressources alimentaires disponibles. Rien que pour les céréales, la FAO (Food and Agriculture Organisation) a estimé qu'il serait nécessaire d'accroître la production de 70% afin de nourrir les 2 milliards de personnes supplémentaires qui vivront sur Terre d'ici 2050. L'augmentation de la production passe irrémédiablement par une qualité physiologique et sanitaire optimale des semences. En effet, les graines sont soumises à un ensemble de stress biotiques (les attaques par les agents pathogènes, les insectes...) et abiotiques (le manque d'eau ou de nutriments...) qu'il est nécessaire de contrôler et de limiter.

La graine est non seulement le vecteur du patrimoine génétique des plantes mais elle est également impliquée dans la transmission de nombreux micro-organismes dont des agents pathogènes. Selon des rapports récents de l'ISTA (International Seed Testing Association) et de l'ISF (International Seed Federation) réalisés sur 22 espèces cultivées, plus de 200 agents pathogènes des plantes sont transmis par les semences (Denancé and Grimault 2021). L'intensification des échanges de lots de semences s'accompagne d'un risque plus important d'introduction d'agents phytopathogènes transmis par les semences. En effet, actuellement environ 90% des plantes cultivées sont propagées sous forme de semences (Etebu and Nwauzoma 2017). Il est donc essentiel de garantir la qualité sanitaire des semences pour éviter l'apparition de maladies dans de nouvelles zones géographiques.

À ce jour, la gestion des agents pathogènes transmis à et par les semences repose sur la prophylaxie, l'utilisation de cultivars résistants et les traitements de semences utilisés pendant la production des semences ou après la récolte (Devi *et al.* 2020). La grande majorité de ces traitements de semences est constituée de fongicides et d'insecticides. Ces traitements représentent entre 60% et 100% des résidus trouvés sur les semences. L'Union européenne a récemment interdit certains de ces pesticides et l'abandon de ces produits est prévu à horizon



2050. Quelles sont les alternatives aux pesticides disponibles aujourd'hui ? En agriculture biologique, les pesticides sont souvent remplacés par des composés à base de sulfate cuivre. Cependant, le cuivre est potentiellement phytotoxique et s'accumule dans les tissus végétaux et les sols. La résistance au cuivre est par ailleurs facilement disséminable entre micro-organismes. Une autre option est basée sur des processus physiques tels que la thérapie ou les rayons UVC. Ces procédés sont toutefois limités à la stérilisation de la surface des semences et ne visent pas les agents pathogènes des plantes qui envahissent l'endosperme ou l'embryon. Enfin, les solutions biologiques, à savoir la biostimulation (ex : pratiques agricoles favorisant les micro-organismes bénéfiques) ou le biocontrôle (ex : enrobage des semences), sont des options prometteuses. Cependant, l'efficacité de ces solutions peut se révéler trop faible pour la biostimulation ou trop variable pour le biocontrôle. En biocontrôle, l'importante variation s'explique généralement par la sélection empirique du micro-organisme employé et la faible viabilité de l'inoculum dans le temps (Bashan *et al.* 2014).

De nouvelles approches pouvant limiter ces variations consisteraient, dans un premier temps, à utiliser spécifiquement des micro-organismes natifs du microbiote des semences comme agents de biocontrôle, en enrobage aux semences. Cependant, il est important de bien caractériser ces micro-organismes dans leur habilité à se transmettre à la jeune plantule. En effet, un micro-organisme retrouvé sur les semences n'est pas nécessairement transmis à la future plantule. C'est pourtant à ces stades précoces du développement de la plante (germination, levée), que le microbiote des semences va agir sur le bon développement de la plante (Nelson 2018). Dans un second temps, il serait intéressant de cibler directement les organes reproducteurs de la plante pour intégrer de manière naturelle les inoculants microbiens aux semences (Mitter *et al.* 2017). En effet, les semences agissant comme un point de départ à l'assemblage du futur microbiote de la plante (Shade, Jacques and Barret 2017), la modulation de leur microbiote à un stade précoce de leur développement pourrait être un moyen efficace de modifier le microbiote de la future plante. Ces deux approches permettront de produire des semences exemptes d'agents pathogènes et/ou de leur associer des agents bénéfiques qui permettront d'assurer la bonne croissance et la bonne santé des futures plantes.

Le déploiement de ces solutions innovantes passe dans un premier temps par une meilleure connaissance des processus écologiques et biologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines. Il est donc nécessaire de connaître :



- **L'origine des membres du microbiote des semences.** Pour le moment, les voies principales de colonisation des graines ont été majoritairement étudiées chez les agents phytopathogènes (Baker and Smith 1966; Maude 1996).
- **Les processus écologiques et biologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines pendant son développement et lors de sa transmission à la plantule.** En effet, mieux décrire l'ordre d'arrivée des taxons microbiens pendant le développement de la graine pourrait permettre de mieux prédire la composition taxonomique du microbiote des graines matures. Les déterminants microbiens impliqués dans ces processus sont par ailleurs méconnus, que ce soit lors de la phase de transmission du porte-graine à la graine ou lors de la germination des graines et la levée des plantules. Enfin, la réponse de l'hôte lors de ces étapes de transmission des micro-organismes n'a été que très peu étudiée.
- **L'impact des membres du microbiote des semences sur le phénotype de la future plantule.** A ce jour, la plupart des agents microbiens utilisés en biocontrôle n'a pas été isolée du microbiote des semences, ils s'avèrent donc difficiles à incorporer de manière efficace et durable sur les semences. Parmi la myriade de micro-organismes phytopathogènes transmis par les semences, nous avons choisi de nous focaliser dans cette thèse sur la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). Des travaux antérieurs au sein de notre laboratoire ont déjà étudié sa transmission à la graine et son impact sur les communautés microbiennes associées aux semences (Rezki *et al.* 2016, 2018). *Xcc* est l'agent causal de la nervation noire des *Brassicaceae*, une phytobactériose induisant des pertes économiques majeures, et soumis à un important contrôle sanitaire des semences (Vicente and Holub 2013).

Les différents points décrits ci-dessus permettront d'améliorer les approches d'ingénierie du microbiote des semences. Il sera alors possible (i) d'identifier les voies d'inoculation les plus permissives pour optimiser les méthodes d'inoculation, (ii) d'améliorer la colonisation et l'installation des inoculants microbiens sur les semences, (iii) d'accentuer la bonne transmission de ces individus à la plantule, et enfin (iv) d'identifier des membres du microbiote limitant l'installation de *Xcc*.



## II. Structure de la thèse

Le manuscrit commence par une synthèse bibliographique. Cette synthèse porte dans un premier temps sur une description globale des principales étapes du développement de la graine. Elle s'intéresse également à démontrer l'importance de la filière semences et les problèmes qu'elle rencontre, en se focalisant sur l'impact des agents pathogènes transmis aux semences et les solutions de lutte disponibles. Dans un second temps, une brève synthèse de la composition du microbiote des plantes est présentée, ainsi que des facteurs impliqués dans sa variation. Dans un troisième temps, nous décrivons les processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des plantes. La quatrième partie sera axée sur la transmission du microbiote de la plante mère à la graine et de la graine à la plantule. Enfin, un dernier point décrira les stratégies de pilotage du microbiote des plantes visant à améliorer la croissance et la santé des plantes.

La seconde partie de ce manuscrit de thèse est composée de 4 chapitres répondant chacun à diverses problématiques.

- **Le premier chapitre** porte sur l'étude de l'assemblage du microbiote des graines au cours du développement de la graine. Cette étude se focalise sur deux espèces végétales distinctes, le radis et le haricot. La grande variabilité en terme de richesse bactérienne associée à ces lots de graines nous a conduit à une seconde étude présentée dans le second chapitre.
- **Le second chapitre** est dédié à l'assemblage des communautés bactériennes au cours du développement des graines, cette fois ci à l'échelle de la graine individuelle. De plus, il y est abordé l'impact de ces communautés sur la germination des graines et l'émergence des plantules.
- **Le troisième chapitre** s'intéresse à l'étude de la réponse immunitaire de l'hôte ainsi qu'à l'identification des déterminants génétiques bactériens impliqués dans l'assemblage du microbiote pendant la colonisation de la plantule.
- Enfin **le quatrième chapitre** a pour but d'identifier des bactéries indigènes des graines qui soient capables de limiter la présence de l'agent pathogène *Xcc* et de décortiquer les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition.



Chaque chapitre débute par une introduction, présentant (i) un rappel succinct du contexte, (ii) les objectifs et les stratégies employées pour y répondre et (iii) la contribution des auteurs aux travaux. Les résultats sont présentés et discutés sous forme d'articles publiés, soumis ou en préparation. Chaque chapitre se termine par une conclusion. Une discussion générale et les perspectives à ce travail de thèse sont présentés dans la dernière partie du manuscrit.



# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



## I. La graine

La graine est un vecteur important de la transmission des micro-organismes entre les générations de plantes (Shade, Jacques and Barret 2017). Cependant, pour se transmettre, les micro-organismes associés aux graines doivent surmonter les spécificités de cet habitat restreint en taille et en nutriments. Ici, ces spécificités seront illustrées en détaillant les différentes étapes du développement des graines et l'anatomie de ces organes graines. Bien évidemment, au vu des très nombreuses spécificités anatomiques des graines et des multiples voies métaboliques impliquées dans leur formation, une synthèse bibliographique complète sur le sujet nécessiterait un ouvrage à part entière. C'est pourquoi je vais faire ressortir dans cette partie un certain nombre de caractéristiques générales de la graine et me focaliser sur l'anatomie et le développement des graines de deux familles de plantes : les *Brassicaceae* et les *Fabaceae*. Ces deux familles de plantes étant utilisées tout au long des travaux réalisés au cours de ma thèse.

### a. Structure et formation de la graine mature

#### i. Terminologie autour de la graine

Il est essentiel dans un premier temps de définir la terminologie autour de la graine. La graine est l'organe commun des « plantes à graines », appelées aussi spermatophytes (sperma pour « semence » et phyte pour « plante »). On retrouve deux divisions taxonomiques au sein des spermatophytes : les Gymnospermes et les Angiospermes. Succinctement, les Gymnospermes (gymnos pour « nus ») se différencient des Angiospermes car elles possèdent un ovule nu. On va retrouver dans cette première Division taxonomique les Conifères, les Cycas et les Gingkos. Les Angiospermes (aggeion pour « capsule ») contrairement aux Gymnospermes possèdent un ovule qui est enfermé dans une structure. Les Angiospermes aussi appelées les « plantes à fleurs » sont groupées en pas moins de 400 000 espèces (S Bachman 2016) et représentent ainsi la quasi-totalité des plantes cultivées. C'est pour cette raison que nous allons développer dans la suite du manuscrit uniquement le développement des graines des plantes de la Division des Angiospermes.

Il est important de bien distinguer le terme de graine et de semence, car ils sont tous les deux utilisés tout au long de ce manuscrit. La graine est le fruit de la reproduction sexuée de la plante qui permet le brassage génétique de l'espèce. Elle va avoir un rôle dans la dissémination de l'espèce par la formation d'une nouvelle plante. Une semence, quant à elle, désigne un moyen de dissémination de l'espèce, mais ne découle pas forcément de la reproduction sexuée, contrairement aux graines. Ainsi, une semence peut être le fruit de la reproduction sexuée comme



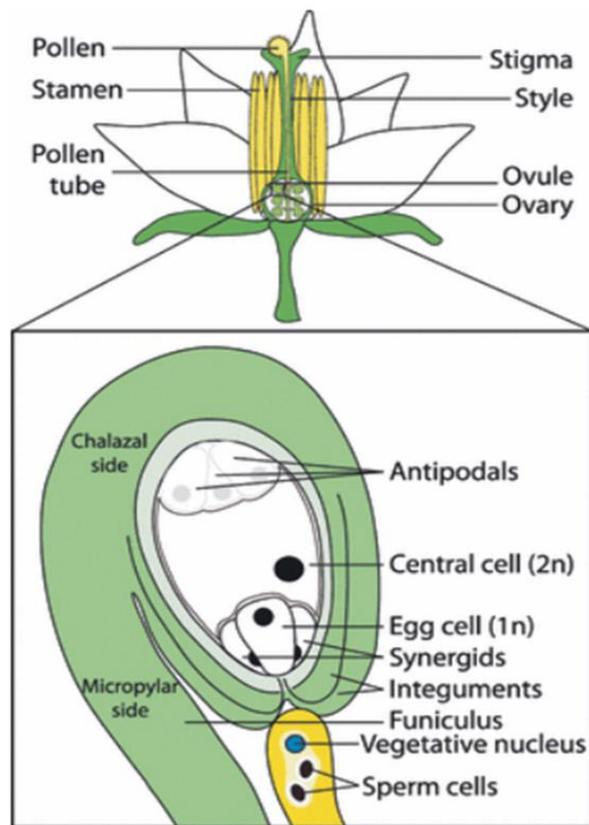
un grain de blé, mais aussi de la reproduction asexuée comme un tubercule de pomme de terre. Associé à cette première définition, les entreprises semencières définissent le terme de semence, comme des graines ou des parties végétales qui vont avoir une bonne qualité physique, physiologique et sanitaire et qui vont pouvoir être semées ou enfouies dans un environnement agronomique.

## ii. La pollinisation

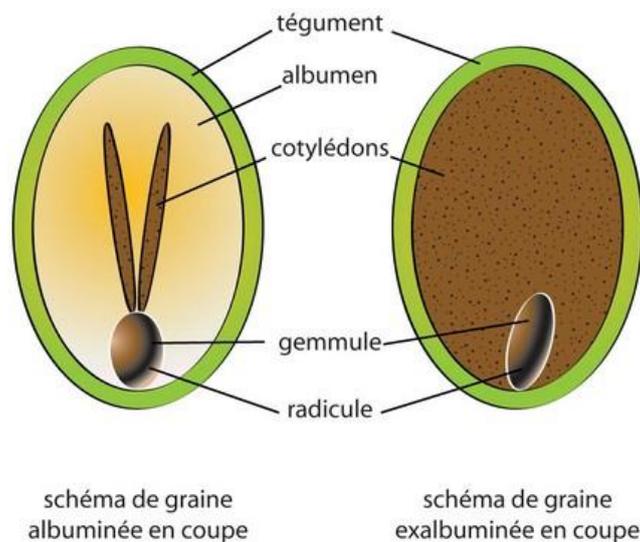
La pollinisation se définit comme le moment où le pollen contenant les gamètes mâles va se fixer sur le stigmate femelle. Elle est soumise à la répartition des sexes chez les plantes à fleurs. Il existe trois classes de répartition des sexes : (i) monoïque, les fleurs mâles et femelles sont séparées, (ii) dioïque, les individus mâles et femelles sont distincts, et (iii) hermaphrodite, la fleur est composée à la fois des organes mâles et des organes femelles. Cette dernière classe est majoritaire chez les Angiospermes, en effet 87 % des espèces d'Angiospermes, dont le radis (*Raphanus sativus*) et le haricot (*Phaseolus vulgaris*) ont des fleurs hermaphrodites. (Saint-Dizier and Chastant-Maillard 2014). Par ailleurs, le mode de pollinisation se différencie en deux types : (i) l'autogamie correspondant à la pollinisation d'une fleur par son propre pollen, et (ii) l'allogamie correspondant à la pollinisation d'une fleur par le pollen d'un autre individu de la même espèce.

Chez les plantes autogames comme le haricot, la pollinisation se réalise avant même que la fleur ne s'ouvre (Bliss 1980). Ce type de pollinisation est efficace car le pollen fécondera majoritairement l'ovule issu de la même fleur (autogamie directe), mais en revanche il ne favorisera pas le croisement génétique au sein de l'espèce. A l'inverse, les plantes allogames, comme le radis, se caractérisent par une fécondation de l'ovule par le pollen issu d'une autre plante de la même espèce. Chez les plantes allogames le brassage génétique de l'espèce va ainsi être favorisé. Ce mode de pollinisation nécessite en revanche une dispersion plus importante du pollen. Cette dispersion peut être réalisée par zoogamie (*via* les animaux), anémogamie (*via* le vent) ou encore hydrogamie (*via* l'eau). Dans le cas du radis, c'est principalement la zoogamie *via* les insectes entomophiles qui va permettre la pollinisation (Zameer *et al.* 2017).

Comme tout système de classification, cette dichotomie des modes de pollinisation est imparfaite. En effet, une plante est en général fécondée par un mode de pollinisation majoritaire (autogamie ou allogamie) mais le second mode de pollinisation peut intervenir de manière plus ou moins importante. Par exemple, chez les espèces autogames comme *Phaseolus multiflorus* et *Vicia faba* (appartenant à la famille des *Fabaceae*), la pollinisation par les abeilles favorise la



**Figure 1 : Structures florales impliquées dans la fécondation.** Après s'être posés sur le stigmate, les grains de pollen germent et s'allongent dans le style. Le tube pollinique transporte les deux spermatozoïdes pour compléter la double fécondation avec l'ovule et la cellule centrale (d'après, Chevalier *et al.*, 2011).



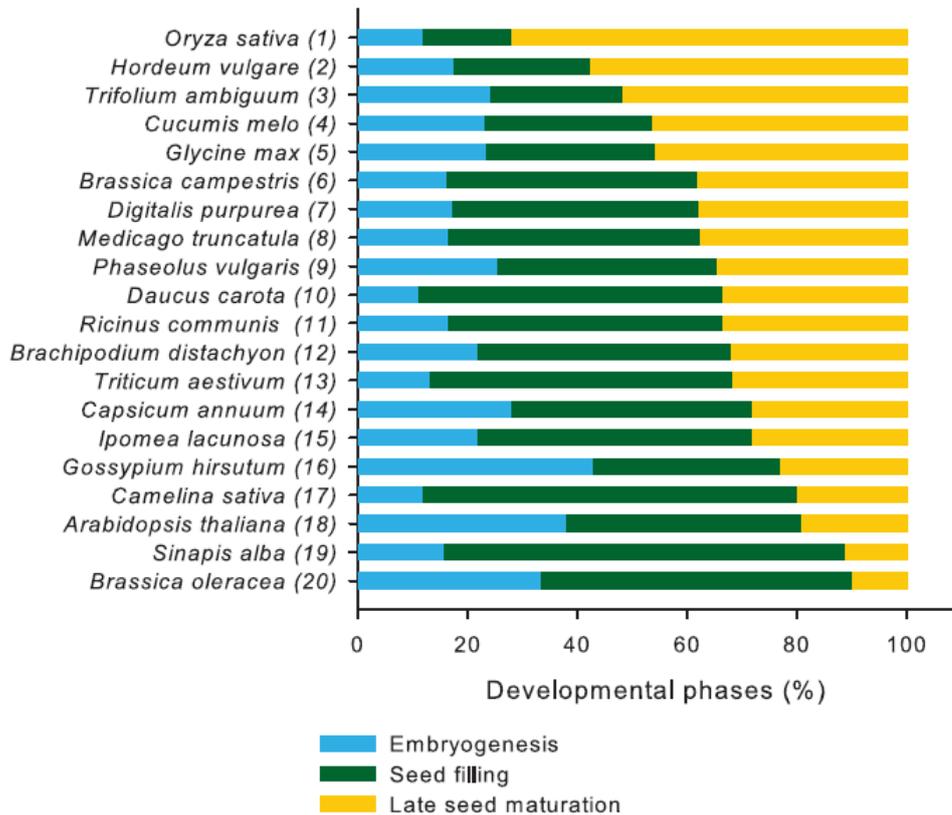
**Figure 2 : Structure d'une graine.** Schématisation de la structure d'une graine albuminée (gauche) et exalbuminée (droite) en coupe longitudinale. Chez les graines exalbuminée, comme le radis ou le haricot, les réserves prennent place dans les cotylédons, contrairement aux graines albuminées qui stockent leurs réserves dans l'albumen (d'après, <https://www.terredegraines.fr>).

fécondation avec un plus grand nombre de graines par gousse et par plante que dans une production sans abeille (Free 1966a). Chez une autre espèce de *Fabaceae*, *Phaseolus vulgaris*, le nombre de graines est identique avec ou sans pollinisateurs suggérant un taux d'allogamie très faible voir nul (Free 1966b). Réciproquement, une plante allogame peut toutefois avoir une part de fécondation autogame. Cependant, l'autogamie est largement limitée par l'auto-incompatibilité. Cette auto-incompatibilité est assurée par une série d'allèles qui vont empêcher le développement du tube pollinique dans le stigmate afin d'éviter l'autofécondation (Bateman 1952). Ainsi, la production de semences de radis F1 est principalement obtenue à partir de lignées auto-incompatibles. Toutefois, cette auto-incompatibilité peut être contournée par des facteurs internes et externes (Ruffio-Châble *et al.* 1997). En effet, une étude portant sur la mesure du taux d'incompatibilité de plusieurs cultivars de radis, a montré qu'aucun cultivar n'était complètement auto-incompatible (Hawlder and Mian 1997).

### iii. La fécondation et le développement de la graine

A la suite de la pollinisation, lorsque le pollen atteint le stigmate, un tube pollinique va se former et va permettre d'acheminer les gamètes mâles vers l'ovule. La reproduction sexuée des angiospermes résulte d'une double fécondation entre le pollen (composé de deux gamètes) et l'ovule (composé de 7 cellules et 8 noyaux, dont le gamète femelle : l'oosphère). L'un des gamètes mâles va féconder l'oosphère pour donner le futur embryon tandis que le second gamète va féconder les deux noyaux polaires de la cellule centrale pour former un tissu de réserve triploïde très énergétique : l'albumen (Chevalier *et al.* 2011) (**Figure 1**).

Après fécondation, le zygote va se développer pour former une graine viable. Le développement de la graine est partagé en 3 phases : (i) l'embryogenèse, (ii) le remplissage de la graine et (iii) la maturation. Lors de l'embryogenèse, le zygote se divise, puis une phase de différenciation cellulaire se met en place pour former les tissus fondamentaux de la graine. Il s'en suit un ralentissement de la division cellulaire en fin d'embryogenèse. Durant le remplissage de la graine, une expansion cellulaire accompagnant une accumulation de composés de réserve a lieu (Baud *et al.* 2002). Chez les semences exalbuminées, telles que le radis et le haricot, la croissance de l'embryon se fait au dépend de l'albumen, les réserves prennent alors place dans les cotylédons tandis que l'albumen se trouve réduit à quelques assises cellulaires (Bewley and Black 1994) (**Figure 2**). Enfin, lors de la phase de maturation, la teneur en eau de la graine chute drastiquement et la graine devient métaboliquement quiescente (Baud *et al.* 2008).



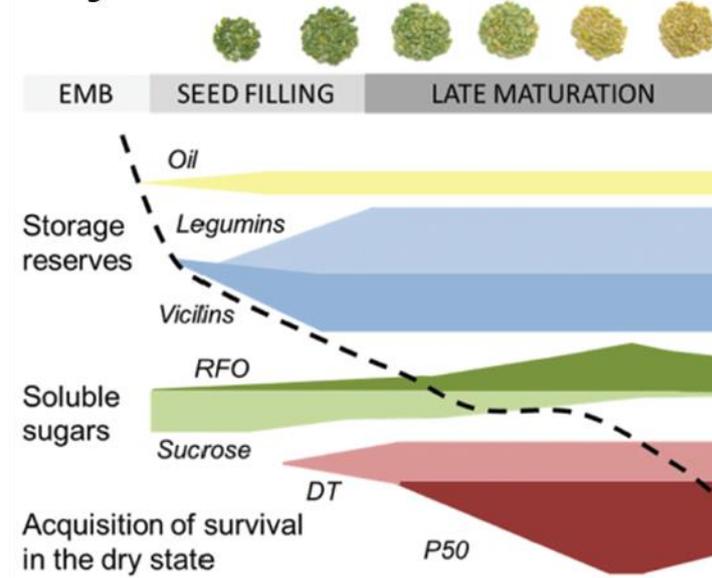
**Figure 3 : Importance relative des trois phases du développement des graines.** Le passage de l'embryogenèse (embryogenesis) au remplissage des graines (seed filling) est défini comme le début de l'augmentation du poids sec. La maturation tardive des graines (late seed maturation) commence lorsque le remplissage des graines cesse. On considère que le développement de la graine est terminé lorsque la teneur en eau de la graine est inférieure à 20% (d'après, Leprince *et al.*, 2017).

La durée de ces différentes phases varie en fonction de la famille botanique. Chez les *Brassicaceae*, l'embryogenèse représente 35 à 40% du temps total de développement de la graine, avec une phase de maturation assez courte (inférieure à 20%). Tandis que chez les *Fabaceae*, les phases d'embryogenèse et de maturation représentent environ 25% et 35% du temps de développement (Leprince *et al.* 2017) (**Figure 3**). Pour les deux familles le temps de la phase de remplissage est proportionnellement similaire par rapport au temps de développement de la graine. Cependant, la nature des réserves accumulées varie entre ces deux familles botaniques :

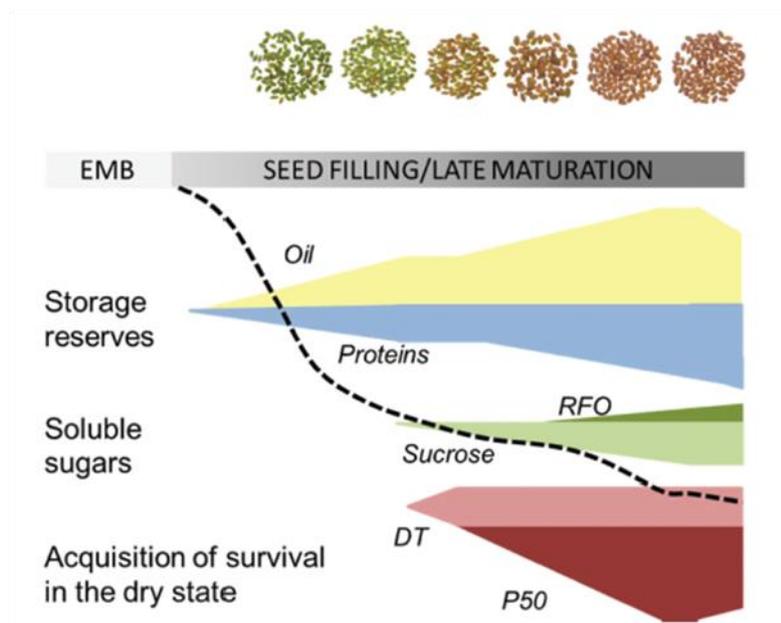
- Chez les *Fabaceae*, les stades de remplissage et de dessiccation sont distincts. En effet, après l'embryogénèse, la graine va accumuler très rapidement une forte quantité de lipides et de protéines, cette augmentation va être stoppée dès le début de la maturation. Du côté des éléments carbonés, la concentration en saccharose est au plus élevée dès le début du remplissage. Elle va ensuite diminuer au cours du temps au profit des oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) (Leprince *et al.* 2017) (**Figure 4A**).
- Chez les *Brassicaceae* après l'embryogénèse, les graines vont initier la synthèse et l'accumulation de lipides et de protéines qui vont augmenter considérablement tout au long du développement de la graine. En effet, une des spécificités des *Brassicaceae* est le couplage des phases de remplissage et de maturation des graines (Zhai *et al.* 2016; Leprince *et al.* 2017). Ainsi le contenu en réserves protéiques et la concentration en oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) vont continuer à augmenter jusqu'à la maturation complète de la graine (Baud *et al.* 2002, 2008; Fait *et al.* 2006) (**Figure 4B**).

Après ces différentes phases de développement, la graine mature va atteindre sa structure anatomique définitive. Il est ainsi possible de différencier chez les *Brassicaceae* et les *Fabaceae* trois principaux compartiments (i) l'embryon, composé d'un axe embryonnaire, de deux cotylédons et d'une radicule ; (ii) les tissus de réserve (l'albumen) et (iii) les téguments (**Figure 2**). Les graines matures vont tout de même avoir de nombreuses différences en terme de composition chimique selon les espèces botaniques. Par exemple, le radis est une graine de type oléagineuse elle va donc avoir une forte concentration en lipides estimée à environ 35% et une concentration en protéines d'environ 20% (Zhao, Ren and Ma 2017). Au contraire, le haricot commun est une graine protéagineuse composée d'environ 1% de lipides contre 20% de protéines en moyenne (Shimelis and Rakshit 2005).

### A. *Medicago truncatula*



### B. *Arabidopsis thaliana*



**Figure 4 : Principaux événements physiologiques et biochimiques liés au remplissage des graines et à l'acquisition de la longévité pendant la maturation tardive des graines. A.** Ces événements sont séparés chez *Medicago truncatula* **B.** contrairement à *Arabidopsis thaliana*. La ligne en pointillée indique la perte d'eau pendant le développement. DT, tolérance à la dessiccation ; EMB, embryogenèse ; P50, demi-vie de la perte de viabilité pendant le stockage ; RFO, teneur en oligosaccharides de la famille du raffinose (d'après, Leprince *et al.*, 2017).

La graine mature va ensuite devoir se disperser et pour cela se dissocier de son fruit. Le radis comme le haricot sont contenus dans des fruits secs déhiscents qui ne se différencient ensuite que par leur système de déhiscence. Le haricot forme des gousses composées d'un unique carpelle qui va s'ouvrir par deux fentes de déhiscence, l'une située au niveau de la structure placentaire (portant les graines), l'autre au niveau de la nervure du carpelle. Le fruit du radis quant à lui est formé de deux carpelles soudés au niveau des placentas et séparé en deux loges par une cloison surnuméraire. La déhiscence va s'effectuer par quatre fentes situées de part et d'autre des placentas, elle est dite paraplacentaire.

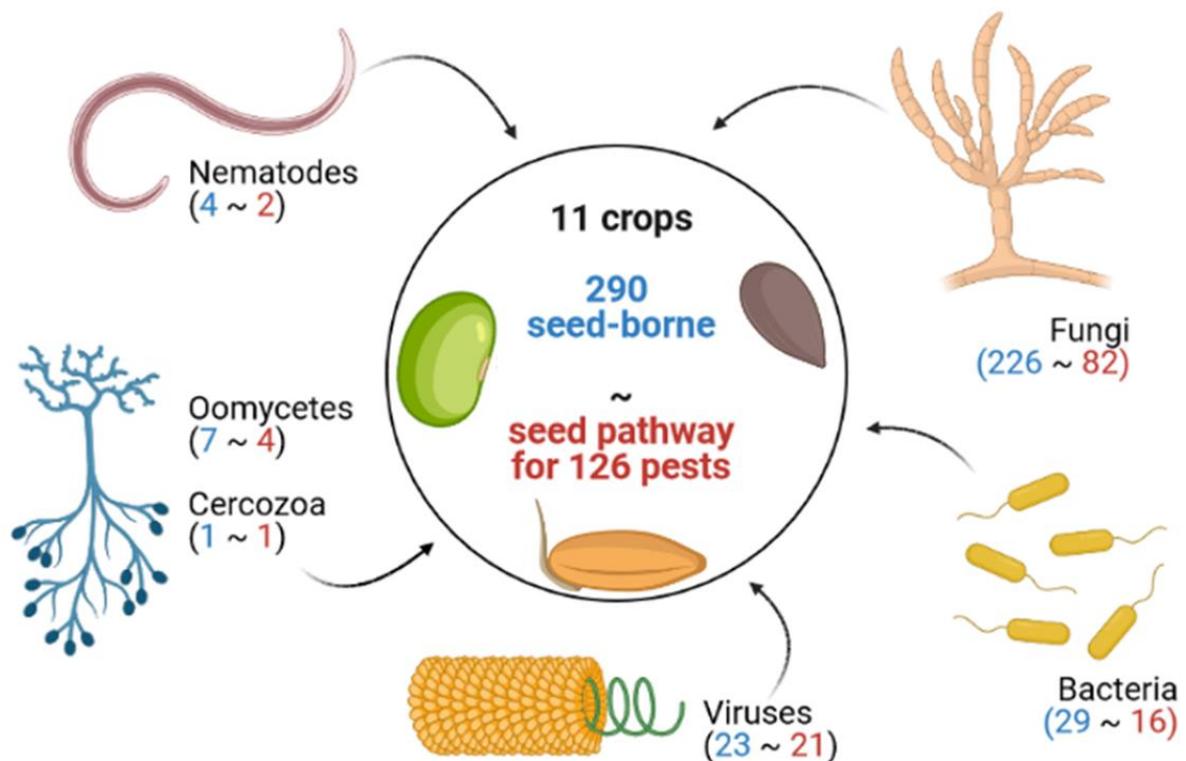
### b. Enjeux autour des semences

Les semences constituent le premier maillon de la production agricole. En tant que telles, elles ont une influence déterminante sur les modèles agricoles ainsi que sur la diversité et la qualité des aliments. Cependant, plusieurs problématiques se posent autour de la production des semences.

La première problématique repose sur la raréfaction des ressources disponibles. Deux ressources se retrouvent majoritairement limitantes, les terres agricoles qui sont de plus en plus limitées dues à l'urbanisation et l'eau qui se raréfie due au réchauffement climatique. La seconde problématique est celle de fournir une ressource alimentaire suffisante en quantité et en qualité. En effet, les modes alimentaires évoluent et la population mondiale est en hausse constante (Lutz, Sanderson and Scherbov 2001). Enfin, la troisième problématique, est de limiter la dissémination de nouvelles maladies et de nouveaux ravageurs qui est favorisée par la circulation des hommes et des marchandises. La semence est le premier vecteur d'échange de plantes au niveau mondial (Etebu and Nwauzoma 2017) avec 5,7 millions de tonnes de graines exportées en 2018 représentant 11,6 milliards d'euros (<https://www.worldseed.org/resources/seed-statistics/>). Ces échanges importants sont liés à une potentielle dissémination des agents phytopathogènes associés aux semences. Ils peuvent ainsi en l'absence de contrôle être responsables d'épidémies dans de nouvelles zones géographiques (Strange and Scott 2005), comme récemment avec l'importation de graines de maïs contaminées par *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* des Etats-Unis vers l'Union européenne (Health (PLH) et al. 2019).

Au vu de ces différentes problématiques trois enjeux majeurs se posent :

- **Le premier enjeu** est de disposer de semences à forte valeur agronomique, qui soient donc productives tout en restant qualitatives. En effet, il est nécessaire de nourrir une



**Figure 5 : Liste des organismes nuisibles de référence de l'ISTA.** Nombre d'organismes nuisibles transmissibles par les semences (bleu) identifiés dans 11 espèces de plantes cultivées (luzerne, orge, coton, avoine, colza/canola, riz, sorgho, soja, tournesol, triticale, blé). En rouge, est représenté le nombre d'agents pathogènes transmissibles par les semences. Les données représentent le contenu de la v7.0 (version février 2021) de la liste de référence des parasites ISTA, International Seed Testing Association. (d'après, Denancé and Grimault 2021).

population mondiale grandissante qui va passer de 7,8 milliards d'habitants à plus de 9 milliards d'ici 2050 (FAO).

- **Le second enjeu** repose sur la mise à disposition de variétés de semences moins consommatrices d'intrants et plus résistantes aux stress biotiques (maladies, ravageurs) et abiotiques (sécheresse, froid).
- **Le troisième enjeu** repose sur la production de semences adaptées aux différents types d'agricultures : conventionnelle ou biologique.

Pour répondre à ces enjeux, il est essentiel de garantir une qualité physique et germinative des semences. Ces deux facteurs sont souvent influencés par des paramètres dépendants du génotype et des conditions de culture des plantes porte-graines. D'autre part, les semences sont enclines à l'invasion par des agents pathogènes, il est donc nécessaire de contrôler la qualité sanitaire des semences. Dans la suite du manuscrit, nous allons spécifiquement nous intéresser à la qualité sanitaire des semences qui est l'enjeu final de la recherche développée dans cette thèse. La qualité sanitaire des semences est essentielle car elle va permettre de prévenir l'apparition de maladies et garantir ainsi la production alimentaire.

### c. Les agents pathogènes transmissibles par les semences

Les premiers travaux portant sur la transmission à et par la semence d'agents phytopathogènes ont eu lieu au cours du 18<sup>ème</sup> siècle avec l'identification sur les semences, de *Claviceps purpurea* l'agent responsable de l'ergot du seigle, d'*Orobanche minor* la petite orobanche du haricot, ou encore d'*Anguina tritici* l'anguillule du blé niellé et de *Tilletia* sp. l'agent de la carie du blé (Baker and Smith 1966). Cependant, les agents phytopathogènes transmis à et par la semence n'ont été que plus largement étudiés à partir du 19<sup>ème</sup> siècle du fait de leur impact reconnu sur les cultures (Baker and Smith 1966). En effet, au cours de ce siècle, de nombreux agents phytopathogènes se sont répandus dans de nouvelles zones géographiques et ont été identifiés comme dispersés par les semences (Anderson *et al.* 2004). A ce jour, la liste de référence de l'ISTA (International Seed Testing Association) recense 290 agents phytopathogènes associés aux semences de 11 espèces végétales, soit 126 combinaisons hôte-organisme nuisible, pour lesquels les semences sont une voie de propagation (Denancé and Grimault 2021) (**Figure 5**). Parmi ces micro-organismes transmis par les semences on retrouve un certain nombre de champignons phytopathogènes, des genres *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium* ou encore *Verticillium* (Singh and Mathur 2004a; Pochon *et al.* 2012). Pour les bactéries, les genres *Acidovorax*, *Clavibacter* ou encore *Xanthomonas* sont les plus fréquemment rapportés et étudiés



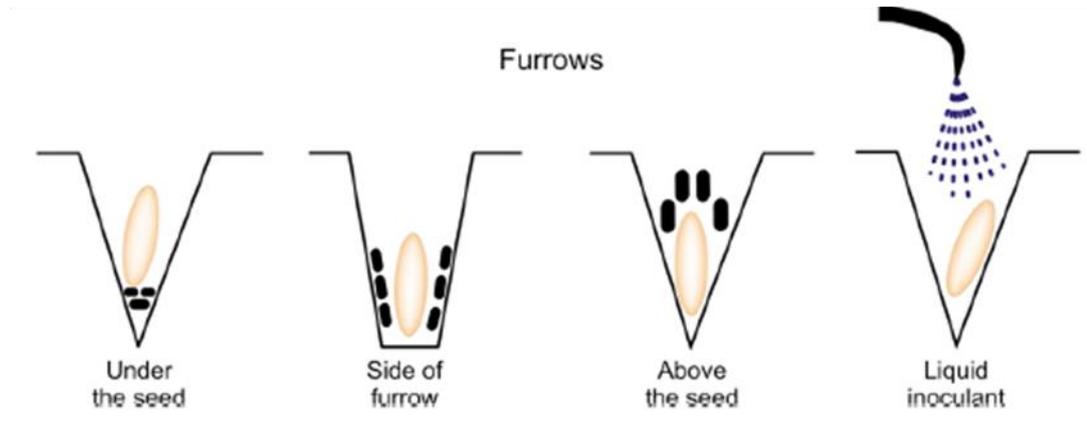
(Lessl, Fessehaie and Walcott 2007; Tancos *et al.* 2013; van der Wolf *et al.* 2019). D'autres agents pathogènes comme des protistes, des oomycètes, des nématodes et des virus sont transmissibles par les semences. Dans le cadre de cette introduction bibliographique, je me focaliserai majoritairement sur les agents phytopathogènes bactériens et fongiques transmis par les semences.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés spécifiquement à l'agent bactérien phytopathogène, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) et à la limitation sa transmission par l'utilisation de micro-organismes isolés de semences. Cette bactérie est l'agent de la pourriture noire des *Brassicaceae* et est identifiée comme transmissible par la semence (Roberts *et al.* 1999b; van der Wolf *et al.* 2019). La nervation noire des *Brassicaceae* est considérée comme la maladie la plus importante de cette famille botanique, elle est disséminée dans le monde entier, et peut impacter la plupart des *Brassicaceae* cultivées mais aussi sauvages (Williams 1980; Bradbury 1986; Vicente and Holub 2013). Avec les résidus de cultures contaminés et les adventices infectées de la famille des *Brassicaceae*, la graine est considérée comme l'une des sources majeures d'inoculum primaire de la nervation noire (Randhawa and Schaad 1984). Par une approche d'hybridation de fluorescence *in situ*, *Xcc* a été détectée dans plusieurs tissus de la graine. Cette bactérie se trouve majoritairement localisée à la surface des racines, dans plusieurs zones embryonnaires de la graine, ainsi que sous les téguments de la graine (Torres-Cortés *et al.* 2019).

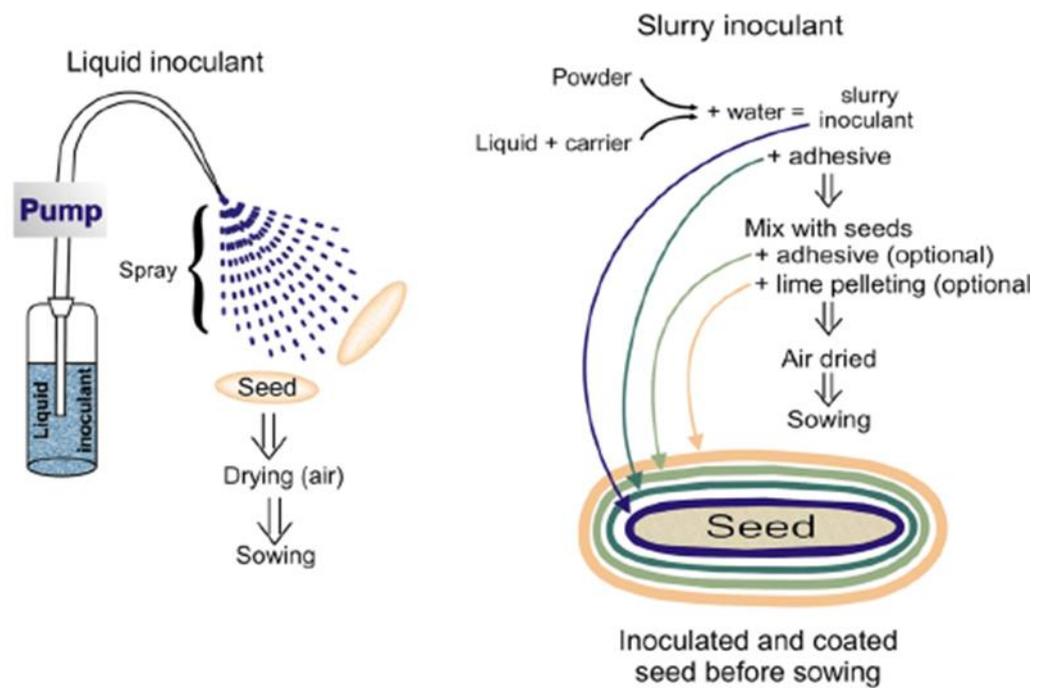
#### d. La lutte contre les agents phytopathogènes transmissibles par les semences

Historiquement, la lutte contre les agents phytopathogènes est basée sur des approches prophylactiques, comme la rotation des cultures, la polyculture, l'ajustement des dates de semis, la mise en jachère, le labourage d'été, le compostage d'engrais vert, ou encore la lutte sanitaire (Kumar 2018). Cependant, au vu de la nécessité d'augmenter les rendements agricoles dans des espaces de plus en plus limités, la plupart de ces approches ont perdu leur acceptabilité comme moyen de lutte et sont actuellement réévaluées comme une composante de la lutte intégrée contre les pathogènes de cultures (Reddy 2013). A ce jour, l'une des principales approches prophylactiques conservée est le contrôle sanitaire et le traitement des semences (Gitaitis and Walcott 2007). En effet, pour pouvoir être commercialisées dans l'Union européenne, les semences doivent être certifiées pour leur faculté germinative, leur pureté spécifique et également pour leur qualité sanitaire. Le contrôle et la certification sont délégués, en France, au

### A. Soil inoculation



### B. Seed inoculation



**Figure 6 : Représentation schématique de l'inoculation des semences.** L'inoculation peut se faire directement dans le sillon de semis (A) ou sur la graine (B) (d'après, Bashan *et al.*, 2014).

Service Officiel de Contrôle et de certification (SOC). Ce certificat est obligatoire pour les semences de grandes cultures et permet de garantir l'absence d'agents pathogènes. Au contraire, les espèces potagères sont exemptes de ce certificat mais elles doivent répondre à un certain nombre de règles et sont testées *a posteriori*. Ces tests vont permettre de vérifier l'identité, la pureté variétale, la faculté germinative ainsi que l'absence de certains agents pathogènes sur les semences. Les tests d'évaluation de la qualité sanitaire des semences sont très coûteux car ils impliquent un nombre important de personnels qualifiés, de technologies non accessibles aux agriculteurs et d'un temps d'analyse conséquent. Pour 250 bioagresseurs identifiés sur les semences, il y a donc plus de 400 prestations d'analyses différentes (Grimault 2019). En plus de ce coût important, les lots détectés comme contaminés au-dessus des seuils établis sont (i) déclassés pour être utilisés pour l'alimentation animale ou (ii) détruits afin d'éviter toutes contaminations des cultures et de dispersion des maladies.

Il est donc nécessaire de limiter au maximum la présence des agents pathogènes sur les semences. Cette limitation dépend majoritairement des produits phytosanitaires et chimiques utilisés lors de la culture ou en traitement post-récolte. Ces traitements post-récoltes reposent sur l'utilisation de fongicides ou d'insecticides en enrobage ou en pelliculage sur les semences (Bashan *et al.* 2014) (**Figure 6**). Ces produits phytosanitaires ont des impacts négatifs avérés sur la sécurité alimentaire, l'environnement et la biodiversité (Ramankutty *et al.* 2018). Ils se révèlent également coûteux et ne ciblent généralement qu'un unique agent pathogène ce qui entraîne l'utilisation d'un cocktail de produits. Enfin les agents pathogènes peuvent développer des résistances aux produits phytosanitaires ce qui implique le développement constant de nouvelles alternatives (Rahman, Ali and ALI 2008).

Aujourd'hui, la demande sociétale est forte sur les sujets portant sur la réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires et sur le développement d'une agriculture plus durable. Ainsi la France développe des plans de réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires (Écophyto II+) et plus largement l'Union européenne a interdit l'utilisation de certains fongicides (ex : triazoles, thirame) et insecticides (ex : néonicotinoïdes, phénylpyrazole) utilisés couramment en application sur les semences. L'utilisation de produits phytosanitaires est restreinte aux agents pathogènes fongiques ou aux insectes, car actuellement aucun produit phytosanitaire n'est développé pour lutter contre les phytobactérioses.



C'est pourquoi, un certain nombre de méthodes de lutte alternatives se sont développées. Elles peuvent être regroupées en trois grandes catégories (Micheloni, Plakolm and Schärer 2007; Sharma *et al.* 2015):

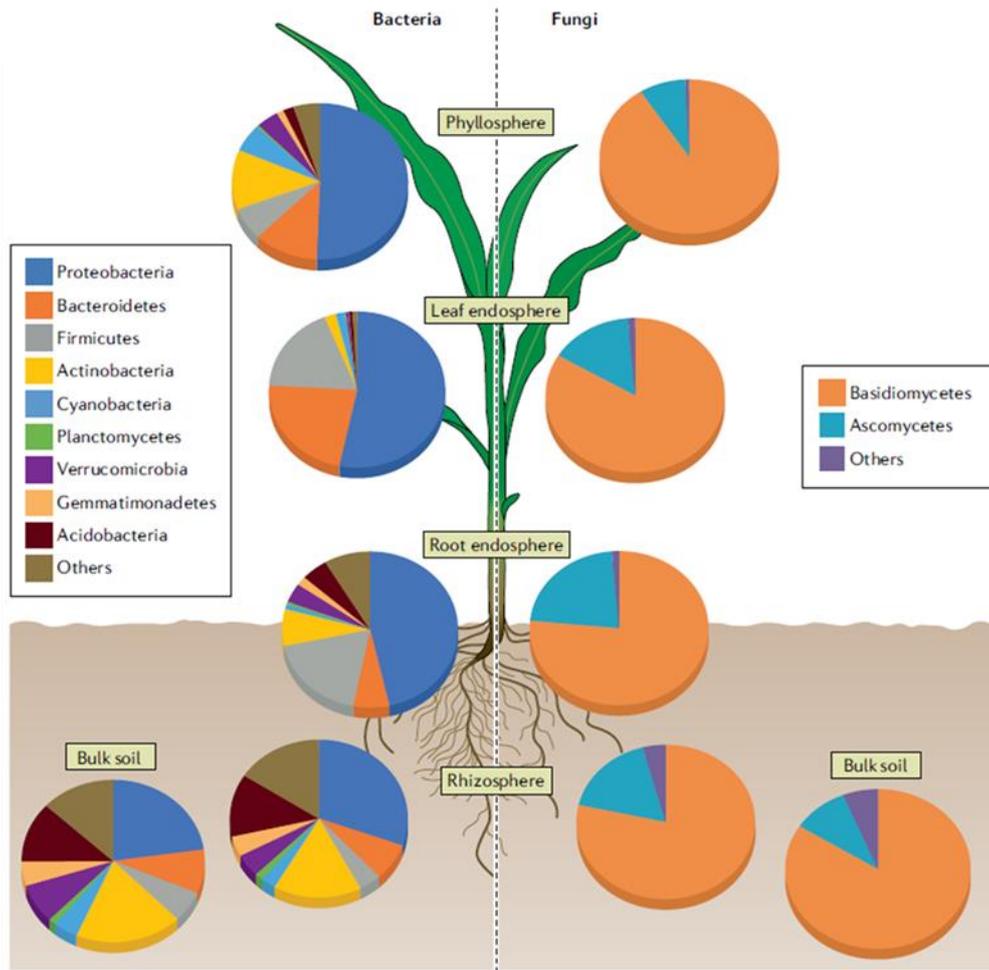
- **Les méthodes physiques** : la thermothérapie (eau, air, vapeur), le rayonnement infrarouge, les UVC, la pression osmotique, les ultrasons, l'application de vide poussé (250mbar), le brossage. Ces méthodes peuvent se révéler efficaces (Govindaraj *et al.* 2017) pour éliminer les agents pathogènes de surface, en plus d'être durables et peu néfastes pour l'environnement. Cependant, elles ne permettent pas d'éliminer les agents pathogènes présents dans les tissus internes de la graine, c'est à dire les tissus de réserves ou l'embryon (van der Wolf, van der Zouwen and van der Heijden 2013). De plus, certaines de ces approches peuvent aussi impacter la qualité des semences en altérant la faculté germinative des graines.
- **Les méthodes chimiques** : l'application aux semences de sulfate de cuivre, d'acides (lactique, acétique), d'alcool, ou encore d'extraits organiques (poudre de lait, moutarde (ex : TILLECUR), extraits de plantes, huiles essentielles). Ces composés peuvent être intéressants au regard de leur impact potentiellement réduit sur l'environnement (Nega 2014). Cependant elles nécessitent souvent de coupler plusieurs produits pour avoir un impact significatif sur l'agent pathogène (el-mougy *et al.* 2012). De plus ces techniques peuvent se révéler coûteuses et ne sont actuellement que trop peu étudiées dans des systèmes agronomiques pour représenter une alternative efficace (La Torre *et al.* 2016). Par exemple, il est maintenant reconnu après des décennies d'utilisation que le cuivre est probablement phytotoxique, qu'il sélectionne des souches résistantes et qu'il s'accumule dans les cultures et dans les sols (Lamichhane *et al.* 2018). Une autre problématique, similaire aux méthodes physiques, est que la plupart des stratégies présentées ici ne vont pas permettre d'éliminer les agents pathogènes dans les tissus internes des graines.
- **Les méthodes biologiques** : biostimulation (basée sur la stimulation des micro-organismes bénéfiques dans les cultures (Rouphael and Colla 2018)) ou biocontrôle (utilisation de micro-organismes antagonistes en enrobé ou en application aux semences (Bashan *et al.* 2014)). Les approches de biostimulation sont peu efficaces



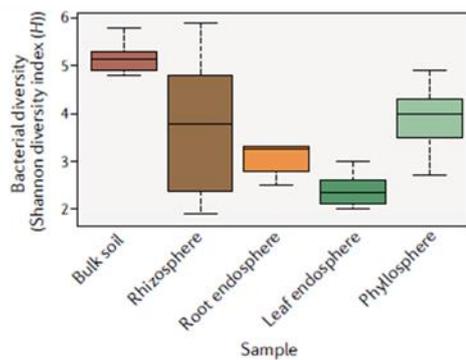
dans des environnements trop perturbés et elles ne sont pas développées dans le but de moduler le microbiote des semences. Pour les approches de biocontrôle, de nombreuses bactéries antagonistes d'agents phytopathogènes ont été identifiées en conditions contrôlées (Bernal *et al.* 2017; Köhl, Kolnaar and Ravensberg 2019). Cependant, il n'existe que très peu de formulations commercialisées applicables sur les semences qui permettent de limiter l'impact d'agents pathogènes (ex : VOTIVO (Bayer Crop Science) ; *Bacillus firmus* limitant l'impact des nématodes). De plus, l'efficacité des formulations microbiennes testées est reportée comme étant très variable. Cette variabilité pourrait être liée au mode de sélection empirique des micro-organismes utilisés et à la viabilité limitée dans le temps de cet inoculum (Bashan *et al.* 2014; Qiu *et al.* 2019).

Dans les alternatives actuellement développées, la première serait de mieux comprendre les traits de la plante et de l'environnement qui vont moduler la composition du microbiote des graines, afin de développer des approches de biostimulation sur semences. La seconde alternative, se base sur des approches de biocontrôle afin de formuler naturellement le microbiote des graines en y intégrant des micro-organismes adaptés à l'habitat (Compant *et al.* 2019). Le but est de limiter la variabilité d'efficacité avérée de ces inoculants et de trouver de nouveaux candidats potentiels de biocontrôle. Ces approches permettront de créer des graines possédant un microbiote avec un rôle significatif dans la bonne croissance et/ou la bonne santé de la future plante. Afin de développer plus largement ces alternatives qui représentent une alternative agronomique durable, il est nécessaire de mieux comprendre le microbiote des semences ainsi que les processus écologiques et moléculaires impliqués dans son assemblage et dans sa transmission à et par la graine.

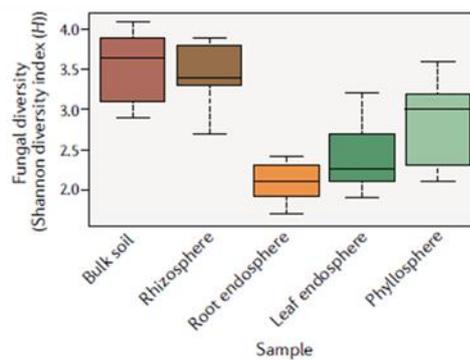
A.



B.



C.



**Figure 7 : Structure taxonomique des communautés bactériennes et fongiques de diverses niches associées aux plantes. A.** La composition du microbiote varie en fonction du compartiment végétal. Les diagrammes circulaires montrent les moyennes des abondances relatives des principaux phyla bactériens (à gauche) et fongiques (à droite) détectés dans le sol, la rhizosphère, l'endosphère des racines, l'endosphère des feuilles et la phyllosphère de diverses espèces végétales. Les abondances ont été estimées par séquençage de gènes marqueurs (ARNr 16S pour les bactéries, et région ITS pour les champignons). Seuls les phyla qui représentaient >0,5% de la population totale dans au moins un échantillon sont inclus. **B et C.** Les diagrammes en boîte montrent la diversité bactérienne (**B**) et fongique (**C**) (indice de Shannon) dans le sol, la rhizosphère, l'endosphère des racines, l'endosphère des feuilles et la phyllosphère de diverses espèces de plantes (d'après Trivedi *et al.*, 2020).

## II. Le microbiote des plantes

Dans la seconde partie de cette synthèse bibliographique la structure du microbiote des plantes, sa dynamique spatio-temporelle ainsi que l'importance de l'espèce végétale dans sa composition seront détaillées. L'impact des changements de composition du microbiote sur le phénotype de son hôte sera également abordé.

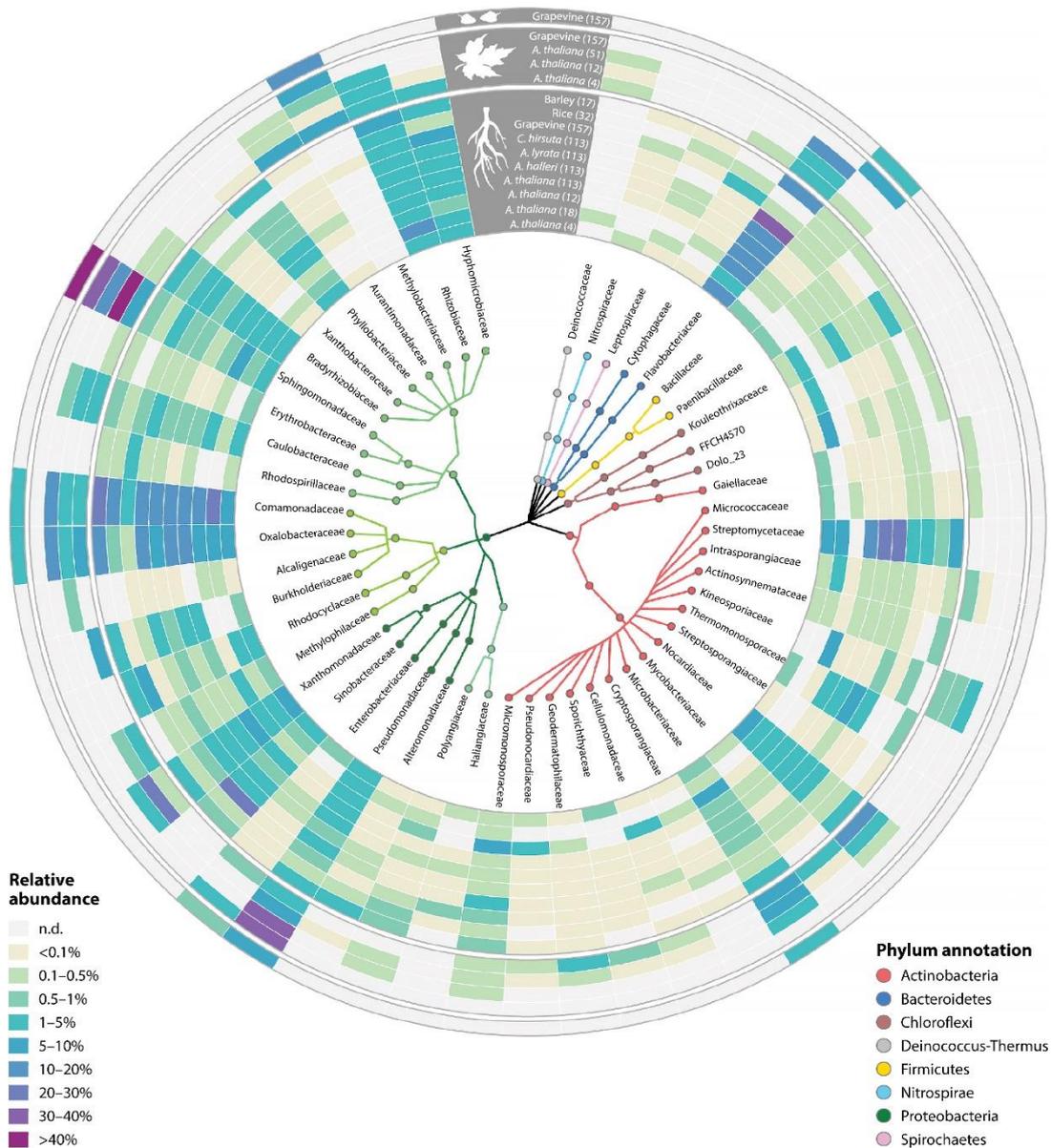
### a. Composition du microbiote

Une large diversité de micro-organismes : archées, bactéries, champignons, oomycètes, protistes et nématodes, est associée aux différents organes de la plante. La structure taxonomique du microbiote des plantes a été principalement caractérisée au sein des fractions bactériennes et fongiques (Trivedi *et al.* 2020). Toutefois, un intérêt croissant pour les fractions virales (Schoelz and Stewart 2018) ou protistes (Xiong *et al.* 2020) a émergé depuis quelques années. Dans cette synthèse bibliographique je me consacrerai majoritairement à la fraction bactérienne du microbiote des plantes car ce sont les ensembles microbiens que j'ai étudié lors de ce travail de thèse.

En considérant le rang taxonomique le plus élevé, quatre phyla bactériens : les Actinobactéries, Bacteroidetes, Firmicutes et Protéobactéries sont majoritairement retrouvés au sein du microbiote des plantes (Bulgarelli *et al.* 2013; Bai *et al.* 2015; Trivedi *et al.* 2020) (**Figure 7**). Il est cependant difficile de prédire le rôle fonctionnel générique de ces phyla étant donné le nombre important d'espèces bactériennes qui leur sont associés. En augmentant la résolution taxonomique, une cinquantaine de familles bactériennes (Müller *et al.* 2016) (**Figure 8**) sont fréquemment détectées dans les différents tissus végétaux ciblés. L'abondance de ces familles est cependant très variable. Ces variations d'abondance voire de prévalence sont en partie expliquées par (i) la dynamique spatio-temporelle du microbiote au sein de son hôte et (ii) l'espèce végétale étudiée (Trivedi *et al.* 2020; Gdanetz, Noel and Trail 2021).

### i. Variation spatiale

Au niveau spatial, deux échelles de compartimentation des micro-organismes peuvent être décrites au sein de l'hôte : soit (i) au sein des tissus de la plante, en surface ou dans les tissus internes, soit (ii) entre les différents organes de la plante. La variation spatiale est importante au sein des plantes, à tel point qu'il est reconnu actuellement que la composition du microbiote est



**Figure 8 : Structure phylogénétique du microbiote végétal.** Les données de séquençage ont été analysées à l'aide par une approche d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et ont ensuite été combinées au niveau de la famille. Sont représentées les familles détectées dans au moins 70 % des études sur le microbiote des racines et des feuilles, respectivement, avec une abondance relative  $\geq 0,1$  % dans au moins une étude. Abréviation : n.d., non détecté (d'après, Müller *et al.*, 2020).

plus impactée par les traits phénotypiques de la plante plutôt que par ses traits génotypiques (Hamonts *et al.* 2018; Guo *et al.* 2021; Wagner 2021).

Les micro-organismes localisés en surface des tissus végétaux sont décrits comme épiphytes, alors que ceux présents au sein des tissus sont catégorisés d'endophytes (Andrews and Harris 2000; Turner, James and Poole 2013). Un gradient de diversité bactérienne et fongique est observé, avec une richesse spécifique plus importante pour les communautés épiphytes que pour les communautés endophytes, et cela pour tous les principaux habitats de la plante, comme la rhizosphère (Bulgarelli *et al.* 2012; Lundberg *et al.* 2012), la phyllosphère (Müller *et al.* 2016) ou encore la graine (Eyre *et al.* 2019). Le nombre de cellules est également plus important en surface des tissus. Par exemple, on estime à environ  $10^6$  à  $10^9$  le nombre de cellules bactériennes localisées en surface des racines (par gramme de racine) contre  $10^4$  à  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> à l'intérieur des tissus (Bulgarelli *et al.* 2013). En ce qui concerne l'habitat graine, les populations bactériennes épiphytes sont estimées entre  $10^4$  à  $10^8$  UFC (Unité Formant Colonie) par gramme de graine (Chimwamurombe *et al.*, 2016 ; Mano *et al.*, 2006) contre des populations endophytes variant de  $10$  à  $10^6$  UFC par gramme de graine (Compant *et al.* 2011; Truyens 2016). Si tous les micro-organismes épiphytes ne sont pas nécessairement retrouvés au sein des tissus de la plante, les micro-organismes endophytes sont quasiment systématiquement retrouvés en surface des organes de la plante, ou du moins à une étape de leur cycle de vie. Un exemple bien documenté de transmission verticale chez les plantes concerne les champignons du genre *Epichloë* chez les *Poaceae* (Schardl, Leuchtman and Spiering 2004). Ces champignons permettent notamment à la plante de se protéger contre les herbivores, par la production d'alcaloïdes. Un autre exemple, à l'intérieur du règne des eubactéries, est le symbiote *Candidatus Burkholderia crenata*, qui est transmis de manière strictement verticale chez les plantes de la famille des *Rubiaceae* (Pinto-Carbó *et al.* 2018).

La seconde échelle spatiale considérée concerne les organes de la plante, avec une première dichotomie entre les parties aériennes et souterraines. D'importantes différences de structure taxonomique existent entre ces deux habitats que ce soit au niveau de l'abondance relative des différents groupes taxonomiques ou au niveau de l'identité des taxons présents (Bai *et al.* 2015; Trivedi *et al.* 2020). Par exemple, le genre bactérien *Methylobacterium* est fréquemment retrouvé à la surface des feuilles de très nombreuses espèces végétales (Vacher 2016), grâce notamment à ses capacités d'utilisation du méthanol en tant que source de carbone (Delmotte *et al.* 2009). A l'inverse, les bactéries des genres *Rhizobium* et *Agrobacterium* sont



majoritairement associées aux racines (Coleman-Derr *et al.* 2016; Poole, Ramachandran and Terpolilli 2018; Amend *et al.* 2019). Cette dichotomie entre organes aériens et racinaires peut être subdivisée de manière plus fine en prenant en compte les spécificités de chaque organe de la plante. On peut alors dissocier des microbiotes spécifiques à chaque compartiment de la plante, comme la caulosphère (tige), la phyllosphère (feuille), la rhizosphère (zone du sol soumise à l'influence des racines), le rhizoplan (surface des racines), l'anthosphère (fleur), la carposphère (fruit), la spermosphère (zone soumise à l'influence de la graine) ou encore la graine (Amend *et al.* 2019; Singer *et al.* 2019; Gao *et al.* 2021). Il est assez difficile de dresser une liste exhaustive des taxons associés à chaque habitat. Cependant, pour prendre l'exemple de l'habitat graine, l'espèce bactérienne *Pantoea agglomerans* et le genre fongique *Cladosporium* sont très fréquemment et abondamment associés aux graines d'une multitude d'espèces végétales (Simonin *et al.* 2021).

## ii. Variation temporelle

Les variations temporelles de composition du microbiote dans les habitats éphémères comme l'anthosphère ou la carposphère sont assez intuitives (Shade, McManus and Handelsman 2013). Toutefois, cette dynamique temporelle se retrouve aussi au sein de compartiments plus « durables ». Par exemple, la composition des communautés microbiennes de la rhizosphère fluctue au cours du cycle de développement de la plante (Chaparro, Badri and Vivanco 2014; Shi *et al.* 2015). En effet, la nature et la concentration des composés relargués par les racines varient selon les stades phénologiques de la plante avec des modifications marquées entre stades végétatif et reproducteur (Chaparro, Badri and Vivanco 2014; Zhalnina *et al.* 2018). Chez *Arabidopsis thaliana*, ces variations temporelles de composition de communautés microbiennes sont même observées à des pas de temps très courts, comme au cours du cycle circadien de la plante (Hubbard *et al.* 2018). La rhizosphère n'est pas le seul habitat présentant des variations de structure temporelle. En effet, des changements d'abondance relative de certains taxons bactériens se retrouvent également en surface des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Maignien *et al.* 2014).

Si la nature des substrats carbonés disponibles au cours du développement de la plante est un moteur important de la variation de la composition des communautés microbiennes qui lui sont associées (DeAngelis *et al.* 2009), d'autres facteurs peuvent également être impliqués dans cette dynamique temporelle. Par exemple, un certain nombre de plantes, comme le soja, le niébé, le chou, le coton ou l'arabette, présente une résistance croissante aux agents pathogènes au cours



de leur développement (Develey-Rivière and Galiana 2007). Cette variation de résistance induit des changements dans la composition du microbiote de la plante, et ceci tout particulièrement entre les stades précoces et les stades tardifs de son développement (Develey-Rivière and Galiana 2007). L'expression différentielle des défenses de la plante et les changements dans la composition des communautés entre ces deux stades de développement, peut être expliquée par l'implication des hormones végétales. En effet, au-delà de leur implication dans la défense (Pieterse *et al.* 2012) (cf : **partie « III. d. », La sélection par l'hôte**), les hormones végétales ont aussi un rôle dans le développement de la plante (Raskin 1992; Vanstraelen and Benková 2012). En dehors de ces exemples relatifs aux parties végétatives, très peu d'études, à ce jour, se sont intéressées à la dynamique d'assemblage des communautés des habitats reproducteurs de la plante. Parmi elles, deux études ont réalisé un suivi dynamique du microbiote de l'anthosphère du pommier (Shade, McManus and Handelsman 2013; Cui *et al.* 2021), tandis que du côté des graines la fraction endophytique des graines de maïs a été caractérisée lors des phases de développement embryonnaire, de remplissage et de dessiccation de la graine (Liu *et al.* 2013). Les auteurs de cette étude ont montré une plus grande diversité de bactéries endophytes dans les premiers stades de développement de la graine par rapport aux stades plus tardifs. Ils ont également décrit une abondance plus importante de certains genres taxonomiques spécifiques selon le stade de développement de la graine.

En conclusion, le stade de développement est un élément essentiel à prendre en compte pour intégrer durablement un inoculum microbien dans la plante, au vu des variabilités importantes qu'il entraîne à l'échelle du microbiote. Au-delà des aspects spatio-temporels, l'espèce ou la famille de plante étudiée va également pouvoir faire varier la composition des communautés microbiennes associées aux plantes.

### iii. Variation au niveau de l'espèce végétale

Des variations dans la composition des communautés microbiennes ont été mises à jour selon la famille, l'espèce, voir la variété végétale étudiée. Par exemple, des variations importantes de composition du microbiote des graines ont été mises en évidence chez les graines de différentes familles végétales comme les *Amaranthaceae* (Lopez-Velasco *et al.* 2011), les *Asteraceae* (Leff *et al.* 2017), les *Cucurbitaceae* (Adam *et al.* 2018a), les *Brassicaceae* (Links *et al.* 2014; Rezki *et al.* 2016; Rybakova *et al.* 2017; Rochefort *et al.* 2019), les *Fabaceae* (Klaedtke *et al.* 2016; Escobar Rodriguez *et al.* 2019), les *Poaceae* (Links *et al.* 2014; Yang *et al.* 2017; Escobar



Rodriguez *et al.* 2019; Eyre *et al.* 2019) ou encore les *Solanaceae* (Bergna *et al.* 2018; Chen *et al.* 2020a).

Ces différences de composition du microbiote observées entre familles botaniques sont expliquées en partie par leurs caractéristiques morphologiques relatives à leur génotype. Par exemple, pour les graines, des caractéristiques comme la taille ou l'anatomie peuvent faire varier la composition des communautés (Barret *et al.* 2015). Ces variations peuvent également être expliquées par la coévolution entre la plante et son cortège de micro-organismes (Delaux and Schornack 2021). Des études récentes ont ainsi montré que la composition du microbiote de la rhizosphère de variétés modernes était significativement différente des variétés anciennes chez la betterave (Zachow *et al.* 2014), l'orge (Bulgarelli *et al.* 2015) ou bien le haricot (Pérez-Jaramillo *et al.* 2017). Ainsi les traits sélectionnés chez ces variétés modernes ont pu mener à la sélection de certains taxons microbiens spécifiques (**cf : partie « III. d. », La sélection par l'hôte**) qui en retour ont permis l'adaptation des plantes à un certain nombre de contraintes biotiques et abiotiques (McLaren and Callahan 2020). Au vu de la variation de la composition du microbiote au niveau de l'espèce végétale, il semble important, de considérer l'étude du microbiote des plantes pour chaque espèce ciblée. Dans la section suivante, nous allons aborder l'impact que peut avoir le microbiote sur la croissance et la santé de son hôte.

## b. Impact du microbiote sur la croissance et la santé des plantes

La plante est un organisme sessile qui doit surmonter un ensemble de stress biotiques et abiotiques pour s'adapter aux conditions environnementales. Pour cela, elle a développé des cascades de réseaux moléculaires permettant d'activer une réponse au stress et de rétablir son homéostasie, de se protéger et de réparer les dommages cellulaires provoqués par ces différents stress (Vinocur and Altman 2005). Il est maintenant établi qu'au-delà de ses fonctions primaires, la plante peut aussi se reposer sur les communautés de micro-organismes qui lui sont associées pour surmonter ces stress et augmenter sa fitness (Vandenkoornhuyse *et al.* 2015; Wei and Jousset 2017). Une théorie a été développée, selon laquelle la plante et sa communauté de micro-organismes pouvaient être considérées comme un méta-organisme (Theis *et al.* 2016), c'est la théorie de l'holobionte (Jefferson 1994; Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008). Le concept d'holobionte reste cependant débattu notamment chez les plantes. La coévolution de l'hôte et de son cortège microbien repose en effet sur la transmission de micro-organismes d'une génération à une autre ou transmission verticale. Le concept d'holobionte a été étendu aux symbiotes non-obligatoires, transmis de manière horizontale (Bordenstein and Theis 2015; Rosenberg and Zilber-



Rosenberg 2018). Toutefois se pose alors la question de la co-sélection de ces ensembles par la plante dans des systèmes agronomiques.

Au-delà du concept d'holobionte, de nombreuses études ont montré que des changements de composition et de structure taxonomique du microbiote ont été corrélés à un certain nombre de modifications phénotypiques de l'hôte. Par exemple, des caractères comme l'accumulation de biomasse (Sugiyama *et al.* 2013), la cinétique de floraison (Wagner *et al.* 2014; Panke-Buisse, Lee and Kao-Kniffin 2017) ou l'adaptation aux stress abiotiques (Lau and Lennon 2012; Xu *et al.* 2018) et biotiques (e.g. (Mendes *et al.* 2011; Kwak *et al.* 2018)) ont été corrélés à des variations de structure taxonomique du microbiote. Certaines de ces modifications phénotypiques ont été confirmées par des approches de transplantation de microbiote. Par exemple, la transplantation de la fraction cultivable du microbiote de la rhizosphère de plants d'*A. thaliana* possédant une cinétique de floraison précoce va induire ce même caractère chez des plantes sauvages inoculées (Panke-Buisse, Lee and Kao-Kniffin 2017). En parallèle, l'inoculation de souches ou de mélange de souches sélectionnées permet d'identifier l'implication des membres du microbiote dans les modifications de caractères phénotypiques étudiés. Par exemple, l'inoculation de la souche *Flavobacteriaceae* sp. TRM1 dans la rhizosphère de la tomate permet de limiter l'incidence de maladie causée par *Ralstonia solanacearum* (Kwak *et al.*, 2018). De même la reconstruction d'une communauté synthétique de sept souches de *Bacteroidetes* inoculées dans la rhizosphère de betterave sucrière permet de diminuer les symptômes causés par le champignon *Rhizoctonia solani* (Carrión *et al.* 2019). Ces communautés restent toutefois assez éloignées des niveaux de diversité et de richesse observés dans les communautés naturelles de micro-organismes associées aux plantes. Ceci dit, une étude a reconstitué des communautés synthétiques composées de plus d'une centaine de souches associant fractions bactérienne, fongique et oomycète. Ces travaux ont démontré l'importance de la fraction bactérienne dans la protection de la plante face aux champignons filamenteux et aux oomycètes (Dùran *et al.*, 2018)

Au niveau de l'habitat graine, des modifications de la structure du microbiote ont été corrélées à des différences de cinétique de germination (Rochefort *et al.* 2019; dos Santos *et al.* 2021) voire de taux de germination (Escobar Rodriguez *et al.* 2019). En effet, certaines bactéries associées aux graines peuvent réprimer la germination des plantes notamment par la production d'oxyviniglycines (McPhail *et al.* 2010; Chahtane *et al.* 2018) ou bien encore diminuer la dormance des graines par la production de cytokinines (Rodrigues Pereira *et al.* 1972; Goggin *et al.* 2015). Le microbiote des graines peut également avoir un impact direct sur le phénotype de la plantule. Par

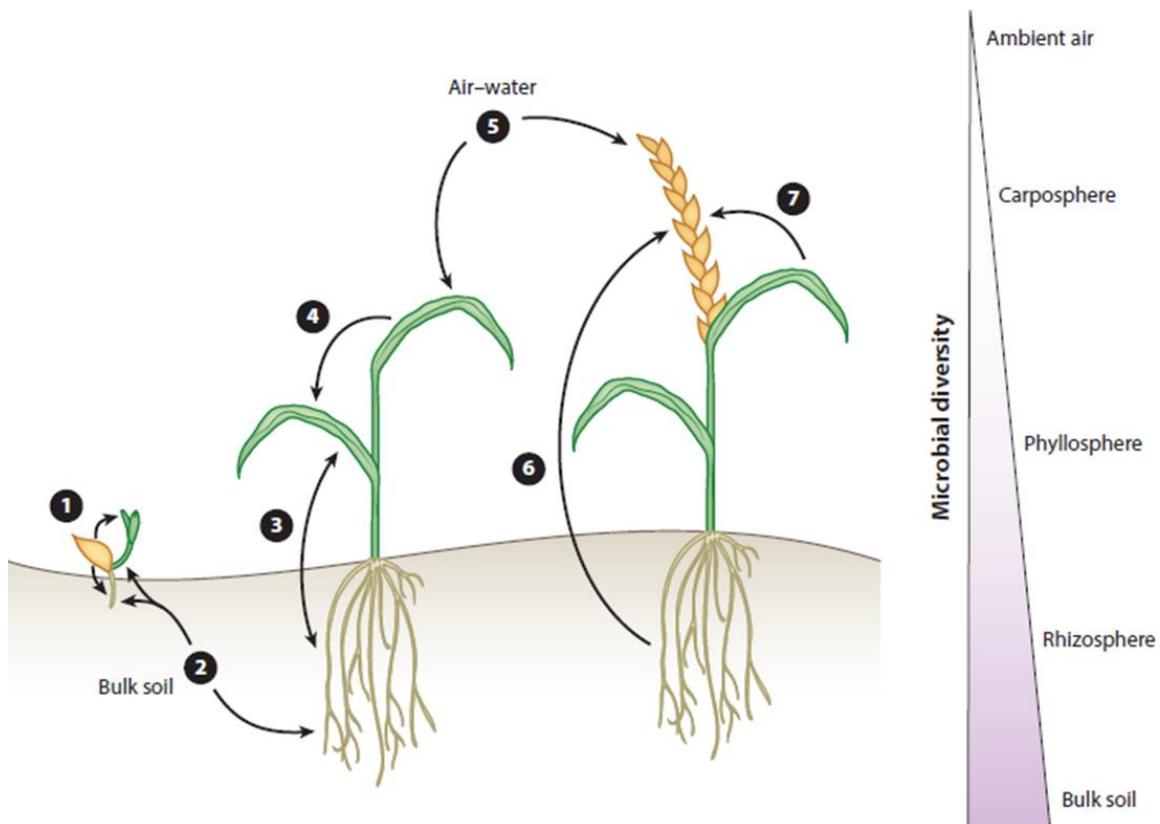


**Figure 9 : Impact de l'inoculation de *Sphingomonas melonis* ZJ26 sur le phénotype de riz sensible à l'agent pathogène *Burkholderia plantarii* (Bp).** Control = témoin, sans inoculation ; +Bp+ZJ26 (inoculation avec la souche ZJ26 + Bp) ; +Bp (inoculation avec Bp). Barre d'échelle, 1 cm (d'après Matsumoto *et al.*, 2021).

exemple, il peut améliorer les capacités d'assimilation des nutriments par la plante. En effet, des bactéries endophytes des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* inoculées sur graines vont améliorer significativement la croissance du cactus cardon géant (Puente, Li and Bashan 2009). La présence de certains micro-organismes au sein des graines peut également favoriser l'établissement de micro-organismes bénéfiques pour la croissance des plantes. Ainsi des grains de blé inoculés avec des souches de *Cladosporium* vont favoriser le recrutement du symbiote *Phialocephala fortinii* dans la rhizosphère de cette espèce végétale (Ridout *et al.* 2019). Dans d'autres cas, le microbiote des graines peut également diminuer l'invasion d'agents phytopathogènes. C'est notamment le cas de bactéries isolées de semences, qui sont capables de diminuer la colonisation des plantules par *Pythium* (Chen *et al.* 2012). Un autre exemple, montre la capacité de *Sphingomonas melonis* à limiter la colonisation des grains de riz par l'agent pathogène *Burkholderia plantarii* (Matsumoto *et al.* 2021) (**Figure 9**). Du côté des champignons, l'inoculation de *Trichoderma* spp. réduit considérablement l'incidence du flétrissement du melon provoqué par *Fusarium oxysporum* infectant les plantules (Gava and Pinto 2016).

Enfin, les micro-organismes associés aux graines peuvent aussi diminuer l'impact de stress abiotiques. Par exemple, *Fusarium culmorum*, un champignon endophyte colonisant les téguments de la graine confère une tolérance au stress salin (Rodriguez *et al.* 2008).

De par son impact dans de nombreux phénotypes de son hôte, le microbiote des plantes est un levier intéressant pour améliorer la croissance et la santé des plantes. Cependant, moduler la composition du microbiote dans le but d'augmenter les rendements des productions végétales nécessite, à ce jour, de mieux comprendre le rôle et les processus d'assemblage des communautés microbiennes.



**Figure 10 : Les plantes acquièrent leur microbiote à partir de différentes sources d'inoculum.**  
**1-** Les graines abritent des micro-organismes qui peuvent coloniser les tissus naissants des racines et des feuilles de la plante. **2-** La plupart du microbiote racinaire et, dans une moindre mesure, du microbiote foliaire est recruté à partir du sol. **3-** Il est proposé que certains microbes puissent se transmettre entre les compartiments de la plante ainsi que depuis les plantes voisines. **4-** Les microbes de la phyllosphère peuvent être transférés entre les feuilles d'une même plante ou vers les feuilles de plantes voisines. **5-** Les microbes en suspension dans l'air et dans les précipitations sont reconnus comme des sources d'inoculum des feuilles et des graines. **6-** Le microbiote des graines ressemble principalement au microbiote des feuilles et **7-** au microbiote des racines (d'après Hassani *et al.*, 2019).

### III. Assemblage du microbiote des plantes

Les traits bénéfiques apportés par les micro-organismes décrits dans la partie précédente peuvent étendre l'adaptabilité de la plante aux conditions environnementales et aux stress biotiques et abiotiques et par conséquent améliorer la fitness de la plante (Vandenkoornhuysen *et al.* 2015). Piloter la composition du microbiote des plantes pour améliorer la croissance et la santé de l'hôte nécessite une meilleure connaissance des sources d'inoculum de ce microbiote ainsi que des processus écologiques impliqués dans l'assemblage de ces communautés (Albright *et al.* 2021). Dans cette partie de la synthèse bibliographique, nous allons commencer par une description des sources d'inoculum des micro-organismes associés aux plantes. Puis, nous allons décrire les processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote. Enfin, nous allons évoquer plus spécifiquement l'importance des processus sélectifs dans cet assemblage.

#### a. Sources d'inoculum des plantes

La majeure partie des micro-organismes est transmise de manière horizontale à la plante. Cette acquisition de taxons par l'environnement est majoritairement issue du sol (Lundberg *et al.* 2012; Schlaeppli *et al.* 2014; Fierer 2017). En effet, les communautés microbiennes de la rhizosphère et du rhizoplan sont quasi-exclusivement composées de taxons telluriques, mais d'autres organes de la plante sont également colonisés par ces micro-organismes du sol (Frank, Saldierna Guzmán and Shay 2017). Ce taux de colonisation n'est cependant pas uniforme entre les habitats. En effet, il existe un gradient négatif de diversité en termes de micro-organismes d'origine tellurique allant de la rhizosphère aux organes reproducteurs de la plante (Coleman-Derr *et al.* 2016; Amend *et al.* 2019) (**Figure 10**). Ces taxons telluriques peuvent coloniser les organes de la plante de manière externe par le déplacement de particules de sol, notamment lors d'épisodes de précipitation, mais également de manière interne via le xylème. La colonisation de ces micro-organismes originaires du sol vers l'intérieur des tissus végétaux est particulièrement importante dans les stades précoces du développement de la plante, soit dès la sortie de la radicule lors de la germination (Nelson 2018), mais également plus tardivement par les racines. En effet, il a été démontré que les micro-organismes pouvaient pénétrer dans les tissus racinaires au niveau des fissures de la zone d'émergence des racines secondaires (Compant, Clément and Sessitsch 2010). D'autres micro-organismes vont dégrader les jonctions entre cellules rhizodermiques à l'aide de cellulases, endoglucanases et xylanases (Liu *et al.* 2017).



En ce qui concerne les parties aériennes des plantes, celles-ci sont colonisées par des micro-organismes issus de l'air (Abdelfattah *et al.* 2019), de la pluie (Morris and Kinkel 2002), des insectes (Prado *et al.* 2019), des poussières ou encore des couverts végétaux (Lympelopoulou, Adams and Lindow 2016). Un exemple d'étude, consistant à placer une plante en plastique dans une culture a permis de démontrer l'importance de l'inoculum aérien dans l'assemblage du microbiote de la phyllosphère. En effet, le témoin en plastique possédait de nombreux taxons en commun avec la surface foliaire de la plante (Ottesen *et al.* 2016). Ceci démontre un phénomène en partie passif d'installation des populations microbiennes en surface des feuilles. Finalement, l'entrée des taxons dans les tissus de la feuille va se faire majoritairement par des ouvertures naturelles, comme les stomates, les hydathodes, les trichomes ou encore les blessures (Mansvelt and Hattingh 1987; De Cleene 1989; Surico 1993). Les micro-organismes de la phyllosphère vont ensuite pouvoir pénétrer dans l'apoplasme, s'ils ont la capacité de contrecarrer les réponses immunitaires de l'hôte (Vorholt 2012).

Les taxons transmis par les graines sont aussi une source d'inoculum pour la plantule et par conséquent pour la future plante (**cf : partie « IV. b. », De la graine à la plantule**). Même si un certain nombre de micro-organismes présents sur les graines ont la capacité de coloniser les plantules (Abdelfattah *et al.* 2021; Kim and Lee 2021), ils ne représentent qu'une faible proportion de l'inoculum de la future plantule par rapport au sol (Rocheffort *et al.* 2021; Walsh *et al.* 2021). En effet, même si les taxons les plus ubiquistes sur les plantules semblent dériver des graines (Walsh *et al.* 2021), une étude a démontré que le sol représentait 35% à 72% de la diversité microbienne retrouvée sur la plantule, contre seulement 0,3% à 15% en provenance de la graine (Rocheffort *et al.* 2021). Ainsi, le pourcentage de taxons transmis par les graines est limité en comparaison avec les autres sources d'inoculum. Cependant, la graine est intéressante comme source d'inoculum car elle représente le premier apport en micro-organismes aux plantes et constitue ainsi la base de l'assemblage du microbiote des plantes. A ce titre, les taxons initialement présents dans cet habitat sont potentiellement importants pour l'installation des autres membres du microbiote de la plante (Ridout *et al.* 2019; Matsumoto *et al.* 2021).

## b. Processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote

Après une première phase d'exploration de la diversité des communautés de micro-organismes associés aux plantes (**cf : partie « II. a. », Composition du microbiote**), de nombreux groupes de recherche ont exploré les processus écologiques impliqués dans l'assemblage de ces communautés.



Il y a une dizaine d'année, une synthèse conceptuelle des nombreux processus impliqués dans l'assemblage des communautés a regroupé ces processus en quatre catégories de base : (i) la dispersion, (ii) la spéciation (ou diversification), (iii) la sélection et (iv) la dérive écologique (Vellend 2010). Cette synthèse a depuis été transposée à l'assemblage des communautés de micro-organismes (e.g. (Nemergut *et al.* 2013)). On peut résumer cette synthèse conceptuelle ainsi : une communauté microbienne va être colonisée par de nouveaux taxons grâce à la dispersion. L'identité et l'abondance de ces taxons peuvent être modulées par la sélection et la dérive écologique. Enfin, de nouveaux membres des communautés peuvent émerger par diversification à partir de taxons existants. Dans la suite de cette synthèse bibliographique, je présenterai l'importance relative des différents processus écologiques dans l'assemblage du microbiote des plantes.

### i. Dispersion

La dispersion se définit par les mouvements des (micro)-organismes dans l'espace (Vellend 2010). Étant donné que la transmission horizontale chez les plantes est une source importante d'acquisition de micro-organismes, la dispersion joue un rôle important dans l'assemblage du microbiote des plantes, notamment lors des phases précoces de son développement. Ce processus est par exemple clef dans l'assemblage des communautés microbiennes associées à la surface des feuilles, comme démontré chez *A. thaliana* (Maignien *et al.* 2014). De même, la dispersion est impliquée dans l'assemblage du microbiote de la spermosphère et des graines (Dini-Andreote and Raaijmakers 2018; Rochefort *et al.* 2019). Par exemple, au niveau d'une parcelle expérimentale, l'utilisation du modèle neutre de Sloan (Sloan *et al.* 2007) a permis de montrer que la dispersion est le processus écologique majeur dans l'assemblage des ensembles fongiques du microbiote des graines de radis (Rezki *et al.* 2018). Il est toutefois assez difficile de mesurer précisément la dispersion des micro-organismes et son évaluation est indirecte, par exemple *via* l'utilisation de modèles écologiques, comme dans les travaux de Rezki (2018) précédemment évoqués. De ce fait, l'impact de la dispersion est également souvent estimé en comparant la distance physique et la dissimilarité entre deux communautés (Fitzpatrick *et al.* 2020). La dispersion est considérée comme importante quand la composition des communautés distantes est très similaire puisqu'elle va homogénéiser les communautés (Mouquet and Loreau 2003; Cadotte 2006). Des approches expérimentales ont cependant montré des résultats en désaccord avec ce modèle théorique. En effet, la présence d'oiseaux pollinisateurs (qui augmentent la distance de dispersion des micro-organismes) augmente la diversité bêta entre les communautés



bactérienne et fongique du nectar de *Mimulus auranticus* (Vannette and Fukami 2017). Cette augmentation de la diversité bêta pourrait être expliquée par des effets importants de priorité. Les effets de priorité sont relatifs à l'importance du temps et de l'ordre d'arrivée des taxons dans une niche écologique (Chase 2003; Fukami 2015). De ce fait, la dispersion étant stochastique, elle génère de la variabilité dans le temps et l'ordre d'arrivée des micro-organismes. Ainsi les premiers taxons colonisant le nectar pourraient s'installer précocement et empêcher la colonisation de l'habitat par les autres micro-organismes dispersés par les pollinisateurs (Vannette and Fukami 2017). Les mêmes résultats ont été observés lors de la pollinisation des fleurs de colza par les abeilles mellifères (Prado *et al.* 2019). En effet, les auteurs de cette étude ont montré que les communautés microbiennes associées aux graines issues de fleurs visitées par les pollinisateurs vont avoir une plus forte diversité bêta que des graines issues de fleurs ensachées (Prado *et al.* 2019). Au-delà des effets de priorité, une hétérogénéité des communautés microbiennes peut voir le jour par limitation de la dispersion. En effet, à travers l'utilisation de modèles neutres, Moroenyane *et al.* (2021) ont montré que la limitation de la dispersion *via* la compartimentation de la plante ainsi que son stade de développement étaient d'importants facteurs de l'assemblage des communautés microbiennes des plantes.

## ii. Diversification

La diversification est un processus qui va générer de la diversité au sein des communautés (Vellend 2010). L'impact de la diversification dans l'assemblage des communautés microbiennes est difficile à estimer dans des habitats ouverts où le flux de micro-organismes est important, comme les plantes. De ce fait, il est difficile de distinguer les membres du microbiote issus de la dispersion et de la diversification (Vellend 2010; Nemergut *et al.* 2013; Stegen *et al.* 2013). Par ailleurs, la diversification se mesure sur des pas de temps importants (plusieurs années) qui ne sont en général pas atteignables dans les dispositifs d'observation expérimentaux. C'est pourquoi, ce processus est rarement documenté dans la littérature dans l'assemblage de microbiote des plantes. A l'échelle de certaines espèces, on peut cependant noter la diversification de souches de *Ralstonia solanacearum* après application d'un cocktail de phages sur plants de tomates (Wang *et al.* 2019). Un autre exemple récent a démontré que la diversification d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* dans le microbiote de la plante aquatique *Lemna minor* altérerait la composition finale du microbiote (Tan, Kerstetter and Turcotte 2021). Il n'existe pas, à ce jour, d'étude de l'impact de la diversification dans l'assemblage du microbiote des semences, mais les



temps de développement des graines (une cinquantaine de jours environ) ne permettent probablement pas de générer de la diversité microbienne par ce processus.

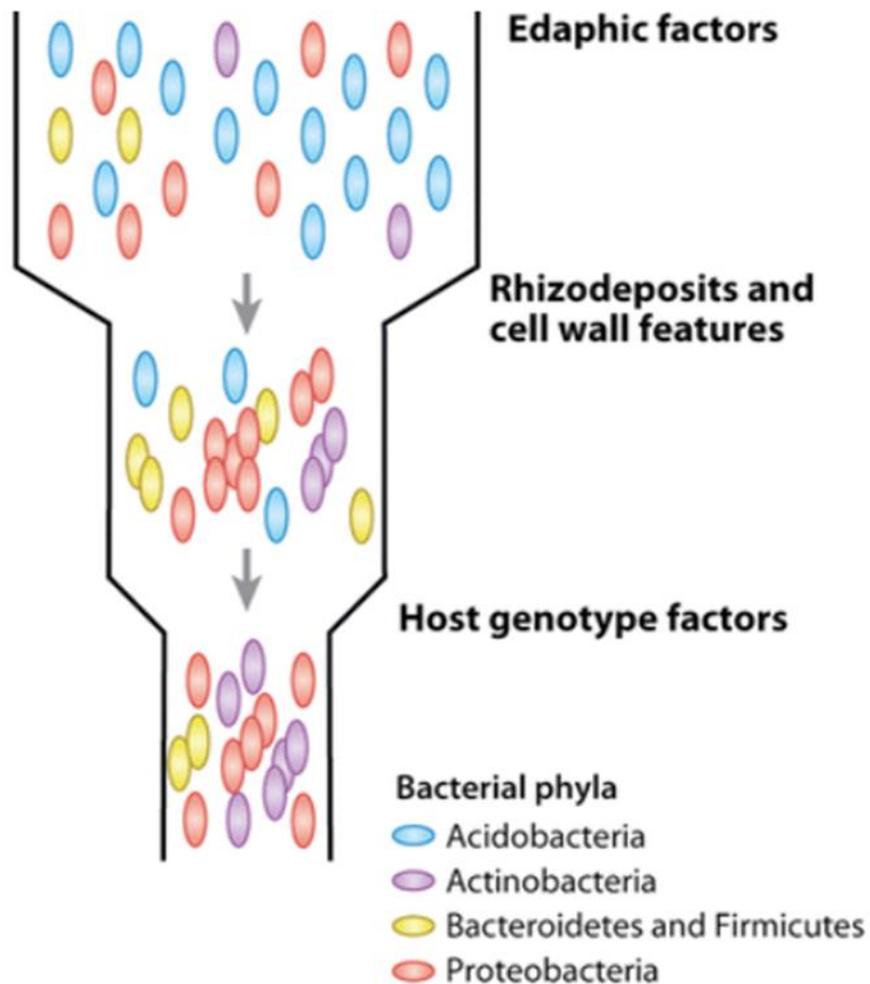
### iii. Dérive écologique

La dérive écologique correspond aux changements stochastiques dans les abondances des espèces (Vellend 2010). La dérive écologique est en général estimée en se basant sur des modèles écologiques issus de la théorie de la neutralité. En effet, en absence de différence de fitness entre individus (absence de sélection), la dynamique des communautés est majoritairement causée par ce processus. Il faut toutefois fixer le taux de dispersion dans ces modèles afin de ne pas estimer la fréquence d'immigration ou d'émigration (Sloan *et al.* 2007).

La dérive écologique est particulièrement importante dans les communautés composées de peu d'espèces ayant une abondance relativement faible et un faible taux de sélection (Nemergut *et al.* 2013; Zhou and Ning 2017). Ainsi, ce processus serait plus important dans le compartiment endophyte en raison de la faible abondance microbienne par rapport au compartiment épiphyte, et ceci tout spécifiquement dans les premiers stades de développement de la plante (Fierer *et al.* 2010; Maignien *et al.* 2014). A l'aide de jeux de données d'observation, il a été démontré que la dérive écologique était impliquée dans l'assemblage des communautés microbiennes des nodules racinaires (Ramoneda *et al.* 2020) et de la phyllosphère (Maignien *et al.* 2014) et dans l'assemblage de la fraction bactérienne du microbiote des graines de radis (Rezki *et al.* 2018). Plus récemment, une étude a utilisé une approche quantitative pour distinguer expérimentalement la dérive des autres processus écologiques, par des expériences contrôlées et l'utilisation de communautés synthétiques simplifiées (Fodelianakis *et al.* 2021). Cette étude suggère que la dérive écologique explique une part importante de la fraction stochastique observée dans les études portant sur l'assemblage des communautés microbiennes.

### iv. Sélection

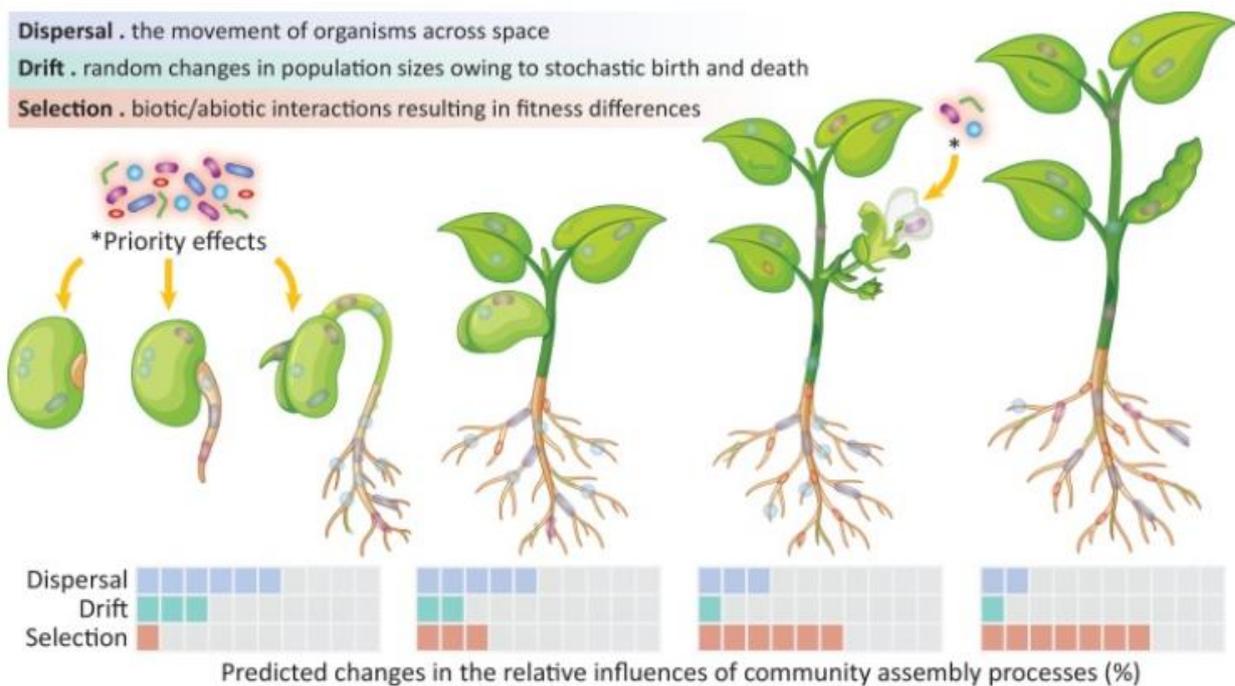
La sélection correspond aux changements dans la structure des communautés, causés par des différences de fitness entre individus (Vellend 2010). C'est le principal processus écologique étudié à ce jour car les moteurs de cette sélection peuvent être manipulés expérimentalement. L'assemblage des communautés microbiennes associées aux plantes est soumis à la sélection par l'environnement mais également par celle exercée par l'hôte. Par exemple, en fonction de la localisation des communautés au sein des différents compartiments de la plante ou des tissus de l'hôte (cf : **partie « I. a. i. », Terminologie autour de la graine**) l'importance relative de ces deux



**Figure 11 : Un modèle de sélection en deux étapes pour la différenciation du microbiote racinaire.** Les facteurs édaphiques déterminent la structure des communautés bactériennes dans le sol. Lors de la première étape de différenciation, les rhizodépôts favorisent la croissance des bactéries organotrophes, initiant ainsi un changement de communautés dans la rhizosphère. Dans la deuxième étape, la sélection dépendante du génotype de l'hôte à proximité et à l'intérieur du système racinaire affine les profils des communautés qui vont réussir à prospérer sur le rhizoplan et à l'intérieur des racines des plantes. (d'après Bulgarelli *et al.*, 2013).

types de sélection peut varier considérablement (Fitzpatrick *et al.* 2020). Pour les communautés associées au compartiment racinaire, un modèle en deux étapes de sélection a été proposé (Bulgarelli *et al.* 2013) (**Figure 11**). Tout d'abord, les facteurs édaphiques et environnementaux vont sélectionner et déterminer la structure du microbiote du sol. Ensuite, la première étape de différenciation de ce modèle prend place. Elle est basée sur une sélection des micro-organismes telluriques au niveau de la rhizosphère et elle est dépendante de la quantité et de la qualité des rhizodépôts disponibles (Sasse, Martinoia and Northen 2018). Dans la seconde étape, au fur et à mesure que les micro-organismes se rapprochent du rhizoplan puis pénètrent dans les tissus racinaires, la sélection par l'hôte devient plus importante, on observe ainsi une plus faible diversité dans le compartiment endophyte que dans la rhizosphère. Cette observation peut cependant varier selon les espèces de plantes étudiées (Bulgarelli *et al.* 2013). Ces deux types de sélection sont donc essentiels dans l'assemblage des communautés microbiennes. Dans le paragraphe suivant nous allons spécifiquement nous intéresser à la sélection par l'environnement, tandis que la sélection par l'hôte, va être abordée dans la suite du manuscrit (**cf : partie « III. d. », La sélection par l'hôte**).

L'environnement, qu'il soit biotique ou abiotique peut fortement impacter la structure des communautés microbiennes associées aux plantes. Les variations de structure des communautés associées aux plantes sont en effet principalement expliquées par la localisation géographique des zones de production que ce soit au niveau de la rhizosphère (Yeoh *et al.* 2017), de la phyllosphère (Zarraonaindia *et al.* 2015) ou bien des graines (Klaedtke *et al.* 2016). Ce sont les propriétés physico-chimiques des sols qui vont principalement induire ces variations géographiques (Berg and Smalla 2009; Thiergart *et al.* 2020). En effet, à travers l'analyse de 7560 échantillons de sols récoltés dans 189 sites différents, il a été démontré que la structure des sols influence plus la composition des communautés microbiennes du sol, que la distance géographique entre les sites (Bahram *et al.* 2018). Néanmoins, le sol seul n'est pas le seul acteur influençant la structure taxonomique du microbiote des plantes, mais les saisons (Thompson *et al.* 1993; Copeland 2015), la température (Coince *et al.* 2014), les radiations UV (Santhanam *et al.* 2015), la lumière (Hou *et al.* 2021) ou encore la disponibilité en eau (Chialva *et al.* 2020) jouent également un rôle. Enfin, les facteurs biotiques de l'environnement impactent également l'assemblage des communautés microbiennes associées aux plantes. Ainsi les pratiques agricoles (Edwards *et al.* 2015; Bodenhausen *et al.* 2019) ou la présence d'organismes macroscopiques comme les insectes pollinisateurs ou les insectes herbivores (Berendsen *et al.* 2018; Huang *et al.* 2019) vont moduler



**Figure 12 : Figure conceptuelle décrivant les influences relatives des processus écologiques d'assemblage des communautés qui médient l'établissement et la dynamique des microbiotes associés aux plantes.** La graine et le système racinaire émergent sont plus enclins aux effets de priorité car ils sont initialement exposés à la colonisation primaire. On suppose également que les effets de priorité sont importants pendant l'assemblage du microbiote des fleurs et des feuilles émergentes. Les surfaces externes des parties aériennes de la plante (feuilles, tiges) sont plus sujettes à la dispersion microbienne et à la dérive, étant donné leur exposition aux facteurs de stress abiotiques et biotiques. On s'attend également à ce que la dérive soit intensifiée dans les communautés à faible densité et à faible richesse car elles sont régulièrement exposées à la dispersion. Dans les compartiments sous-terrains, on suppose que le rhizobiome est influencé par une interaction complexe entre la sélection, la dispersion et la dérive, avec un changement progressif de la sélection à mesure que la plante vieillit. Les mécanismes qui assurent l'équilibre entre ces processus d'assemblage des communautés dans différents compartiments de la plante varient en fonction du génotype/phénologie de la plante, du type de sol, des facteurs de stress biotiques/abiotiques et des pratiques de gestion agricole. Le processus de spéciation (ou "diversification") ne devrait être prononcé que parmi les ensembles de communautés qui n'échangent pas d'individus par dispersion. L'influence relative de ce processus particulier n'est pas représentée dans la figure conceptuelle (d'après Dini-Andreote and Raaijmakers, 2018).

la composition des communautés associées aux plantes. L'autre grande classe d'interactions biotiques, modulant la structure du microbiote des plantes, concerne les interactions entre les micro-organismes. Cette interaction va être discutée dans la prochaine partie de cette thèse.

En conclusion de cette partie portant sur les processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des plantes, un schéma conceptuel a été proposé par Dini-Andreote and Raaijmakers, (2018) (**Figure 12**). Ce schéma montre l'évolution de la part des différents processus écologiques impliqués dans l'assemblage des communautés microbiennes au cours de développement de la plante. Ils proposent que les graines et les premiers stades du développement de la plantule soient fortement impactés par des effets de priorité, dus à une colonisation primaire des tissus. Ces effets de priorité seraient stimulés par une forte dispersion des micro-organismes. La graine est également impactée par la dérive écologique du fait de sa faible biomasse et diversité microbienne (Evans, Martiny and Allison 2017) et elle est par conséquent faiblement impactée par la sélection. Succinctement, dans les stades autotrophes de croissance de la plante, les auteurs proposent que les processus de sélection augmentent graduellement au détriment des processus de dispersion (Dini-Andreote and Raaijmakers 2018).

### c. Interactions inter-microbiennes

Les micro-organismes interagissent constamment entre eux dans un continuum allant du mutualisme au parasitisme. Dans cette partie, nous allons particulièrement nous intéresser à la compétition entre micro-organismes notamment pour les ressources et l'espace (Ghoul and Mitri 2016). En effet, l'habitat d'une plante quel qu'il soit est un espace défini où les micro-organismes vont rentrer en compétition pour les ressources mais également pour l'espace. Le modèle d'étude de ma thèse, la graine, est un espace restreint en terme de taille et de nutriments et donc potentiellement soumis à une importante compétition inter-microbienne. Cette notion de compétition sera abordée sous l'angle de (i) la compétition par interférence et (ii) la compétition pour l'exploitation des ressources.

#### i. Compétition par interférence

La compétition par interférence est médiée par la production par des micro-organismes de composés qui vont inhiber la croissance d'autres micro-organismes (Ghoul and Mitri 2016). Cette compétition peut être dépendante d'un contact intime entre les souches ou indépendante d'un quelconque contact.



Le premier type de compétition présenté est la compétition par contact. Elle est majoritairement effectuée par le système de sécrétion de type VI (T6SS). Le T6SS est une arme moléculaire déployée par certaines bactéries pour injecter des effecteurs et des toxines dans les cellules eucaryotes et procaryotes (Russell, Peterson and Mougous 2014). Le T6SS a un rôle important dans les compétitions inter-microbiennes, à la fois entre bactéries commensales et pathogènes des plantes (Bernal, Llamas and Filloux 2018). Par exemple, *Agrobacterium tumefaciens* et *Pantoea ananatis* sont capables d'utiliser leur T6SS afin d'injecter des toxines dans leurs compétiteurs bactériens (Ma *et al.* 2014; Shyntum *et al.* 2014). De manière intéressante, le T6SS peut agir sur l'intégralité du microbiote, car en plus d'inhiber les individus procaryotes, il peut également s'attaquer aux cellules eucaryotes (Russell, Peterson and Mougous 2014). Par exemple, le T6SS de l'agent phytopathogène *Pseudomonas syringae* DC3000 lui permet d'être compétitif face à des bactéries mais également face des micro-organismes eucaryotes tels que des levures ou des amibes (Haapalainen *et al.* 2012).

Le second type de compétition par interférence, est indépendant d'un quelconque contact entre les individus. Il va résulter de la sécrétion dans le milieu de composés antimicrobiens diffusibles ou volatiles (Riley and Gordon 1999). Le spectre d'action de ces composés peut être plus ou moins large et un même composé peut cibler des cellules procaryotes ou eucaryotes (Raaijmakers, Vlami and de Souza 2002; Coleman *et al.* 2011), c'est le cas notamment des phénazines. En effet, les phénazines, sont des métabolites diffusibles, produits par des souches de *Pseudomonas* et de *Streptomyces*, qui vont avoir des rôles antibiotiques, antimalariaux et encore antiparasitaires (Laursen and Nielsen 2004). Au-delà de leur fonction inhibitrice, les métabolites diffusibles peuvent être perçus comme des molécules signalétiques et ainsi intervenir dans la structuration du microbiote des plantes (Maida *et al.* 2016; Helfrich *et al.* 2018). Un exemple intéressant d'interaction microbienne tripartite concerne un champignon bénéfique pour la croissance des plantes (*Mortierella*), une bactérie endosymbiotique du champignon (*Mycoavidus*), et des nématodes. Dans cette interaction complexe, la bactérie endosymbiotique est capable de sécréter une toxine diffusible protégeant le champignon des attaques de nématodes mycophages (Büttner *et al.* 2021).

En plus des composés antimicrobiens diffusibles, des molécules volatiles peuvent également influencer l'assemblage des communautés microbiennes. Il s'avère qu'elles ont été longtemps négligées dans la compréhension des interactions microbiennes, alors que leur rôle dans la constitution du microbiote peut être important (Schmidt *et al.* 2015). Par exemple les



composés volatiles sécrétés dans le milieu par les champignons endophytes *Muscodor albus* et *Oxysporus latemarginatus* inhibent fortement la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes, dont *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia solani* (Strobel *et al.* 2021). Un second exemple, démontre l'activité antibactérienne de composés volatiles (gamma-butyrolactones) sécrétés par des bactéries. Ces composés présentent une activité antibactérienne contre une large gamme de bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Schulz *et al.* 2010).

## ii. Compétition par exploitation des ressources

La compétition par exploitation des ressources consiste à exploiter les ressources de manière plus efficace que son compétiteur (Ghoul and Mitrì 2016). Pour cela, les bactéries vont développer des stratégies par (i) une meilleure métabolisation des ressources et/ou par (ii) la sécrétion de métabolites permettant de dégrader ou de capturer les nutriments dans le milieu.

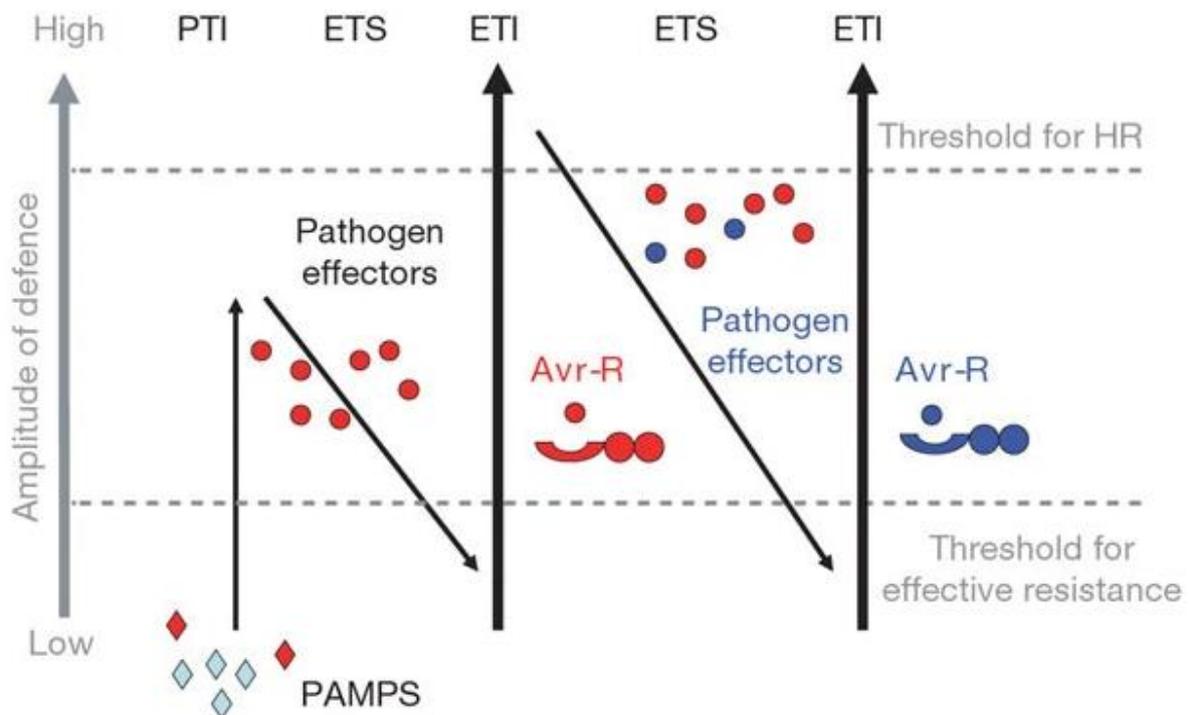
Dans le premier cas, une étude a démontré l'implication de traits microbiens liés à la copiotrophie, tels que le métabolisme des glucides ou des acides aminés, comme étant des déterminants favorisant la colonisation de la plantule par les bactéries (Barret *et al.* 2015; Yang *et al.* 2017; Torres-Cortés 2018). Le second cas a été bien plus étudié à ce jour. En effet, des micro-organismes ont développé des stratégies basées sur la synthèse de molécules permettant de dégrader des nutriments complexes ou bien des molécules capables de piéger des micronutriments. Un exemple connu de système pour piéger les micronutriments est les sidérophores. En effet, en cas de limitation en fer du milieu, certains micro-organismes sont capables de synthétiser et de sécréter des sidérophores dans le milieu, qui vont pouvoir chélater le fer dans le milieu. Le complexe fer-sidérophore ainsi formé, va être spécifiquement capté par les récepteurs transmembranaires du producteur du sidérophore, et lui permettre d'assimiler le fer (Wandersman and Delepelaire 2004). La synthèse de sidérophores bénéficie au producteur mais va être néfaste pour les autres membres du microbiote qui n'auront plus de fer biodisponible pour leur métabolisme (Kramer, Özkaya and Kümmerli 2020). Même si la synthèse de sidérophores montre un intérêt compétitif important par la séquestration du fer, ils restent relativement coûteux à produire. En plus, ils présentent le désavantage d'être utilisables par d'autres individus de la communauté. En effet, certains micro-organismes vont pouvoir profiter des produits sécrétés par d'autres membres de leur communauté pour leur propre bénéfice, c'est ce que l'on appelle la stratégie de « cheating ». Dans certaines communautés bactériennes, des populations de producteurs et de non producteurs de pyoverdines (sous famille des sidérophores (Wandersman and Delepelaire 2004)) coexistent. Les premiers synthétisent la pyoverdine tandis



que les seconds ont des gènes codant pour des récepteurs qui vont leur permettre de capter les pyoverdines. Pour contourner cette stratégie, les producteurs vont ainsi développer une multitude de pyoverdines avec des structures différentes (Butaité *et al.* 2017). De nombreux exemples de compétition par la sécrétion de sidérophores existent dans la littérature. Mercado-Blanco et Bakker (2007) ont ainsi synthétisé les connaissances sur les sidérophores synthétisés par des *Pseudomonas* spp, agissant comme des molécules inhibitrices de la croissance d'agents phytopathogènes fongiques, tels que *Fusarium oxysporum*, *Pythium* ou encore *Botrytis cinerea*. Cette compétition est également importante à l'échelle de la communauté. Par exemple, il a été démontré une importante compétition pour le fer, entre un consortia microbien et l'agent phytopathogène *Ralstonia solanacearum*. Il s'avère que cette compétition est médiée par la synthèse de sidérophores par le consortia. Les sidérophores induisent ainsi une diminution de la biodisponibilité en fer pour l'agent pathogène et par conséquent son inhibition (Gu *et al.* 2020a).

#### d. La sélection par l'hôte

Comme cela a été exposé précédemment, la plante va en partie sélectionner son microbiote en plusieurs étapes (cf : partie « III. b. iv », La sélection par l'hôte). Cette sélection se réalise de l'environnement à la surface des tissus puis, de la surface des tissus à l'intérieur des tissus. Ce gradient de diversité microbien est corrélé à un impact de plus en plus fort du génotype de l'hôte (Bulgarelli *et al.* 2013). Le génotype de l'hôte est responsable de 1 à 10 % (Pérez-Jaramillo *et al.* 2017; Walters *et al.* 2018) de la variation de la composition des communautés microbiennes de la plante. Il va influencer la structure des ensembles microbiens de tous les compartiments de la plante, comme la rhizosphère (Walters *et al.* 2018; Thiergart *et al.* 2020), les racines (Fitzpatrick *et al.* 2018), la phyllosphère (Laforest-Lapointe, Messier and Kembel 2016; Wagner *et al.* 2016) mais également les graines (Gagic *et al.* 2018; Rochefort *et al.* 2019). Certains déterminants génétiques spécifiques de la plante ont été directement impliqués dans ces modifications de compositions de communautés, confirmant l'importance du génotype et des caractéristiques morphologiques associées. Par exemple, des plantes mutées dans leur capacité de synthèse de la cuticule au niveau des feuilles induisent des changements dans la composition des communautés bactériennes associées à la phyllosphère (Reisberg 2013; Bodenhausen 2014). Outre le génotype, le compartiment de la plante (Bulgarelli *et al.* 2013), la sécrétion de métabolites (Stringlis, de Jonge and Pieterse 2019), l'âge (Wagner *et al.* 2016), les exsudats excrétés (Bais *et al.* 2006) ou encore l'immunité de la plante peuvent tous être des facteurs influençant la structure du microbiote de la plante.



**Figure 13 : Modèle en zig zag.** Dans ce schéma, l'amplitude finale de la résistance ou de la sensibilité à la maladie est proportionnelle à [PTI - ETS + ETI]. Dans la phase 1, les plantes détectent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MAMPs/PAMPs, losanges rouges) via les PRRs pour induire l'immunité déclenchée par les PAMPs (PTI). En phase 2, les agents pathogènes réussissent à délivrer des effecteurs qui interfèrent avec l'ITP, ou qui permettent la nutrition et la dispersion des agents pathogènes, ce qui entraîne une sensibilité déclenchée par les effecteurs (SDE). Dans la phase 3, un effecteur (rond rouge) est reconnu par une protéine NB-LRR, activant l'immunité déclenchée par l'effecteur (ETI), une version amplifiée de la PTI qui dépasse souvent un seuil d'induction de la mort cellulaire hypersensible (HR). Dans la phase 4, on sélectionne des isolats d'agents pathogènes qui ont perdu l'effecteur rouge, et peut-être acquis par de nouveaux effecteurs par le biais du flux génétique horizontal (en bleu) - ceux-ci peuvent aider les agents pathogènes à supprimer l'ETI. La sélection favorise les nouveaux allèles NB-LRR des plantes qui peuvent reconnaître l'un des effecteurs nouvellement acquis, ce qui entraîne à nouveau l'ETI (d'après Jones et Dangl, 2006).

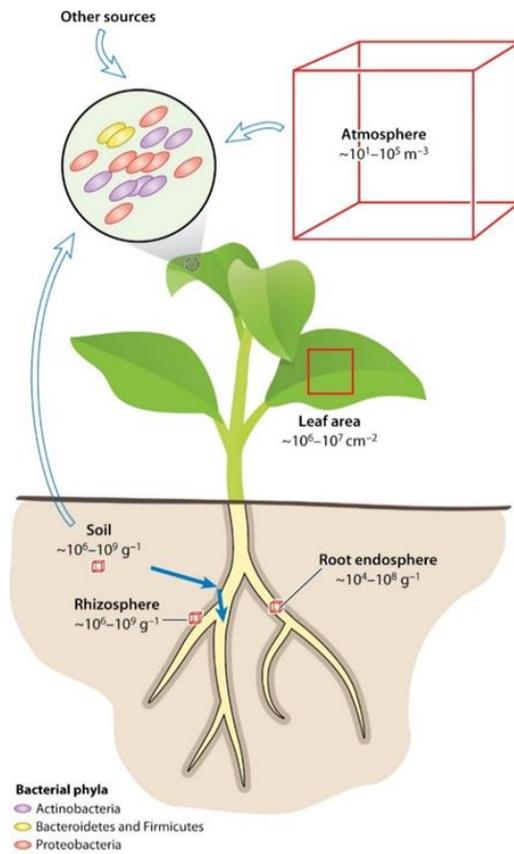
Après avoir passé les barrières physiques de la plante, les micro-organismes vont se confronter à son système immunitaire. Cette confrontation implique une course à l'armement qui peut s'expliquer à travers un modèle, le modèle zig zag (**Figure 13**). Brièvement, ce modèle inclut deux types de récepteurs de la plante : PRR (Plant Recognition Receptor) et NLR (Nucleotide-binding Lecine-rich Repeat) qui vont activer les défenses des plantes en réponse à la détection d'un agent microbien. En contrepartie, cette défense pourra être contournée par des molécules induites par ces derniers (Jones and Dangl 2006). Plus en détails, les PRR sont situés à la surface des cellules végétales et vont fixer des épitopes microbiens souvent conservés, comme la flagelline bactérienne ou la chitine fongique (Microbe Associated Molecular Pattern (MAMP)). Après fixation, les récepteurs vont transmettre la perception de ces signaux aux voies de signalisation intracellulaires pour l'activation de réponses antimicrobiennes afin de réduire la colonisation par l'agent microbien. La réponse immunitaire déclenchée par ces récepteurs est appelée MAMP-triggered immunity (MTI). La deuxième classe de récepteurs immunitaires (NLR) réside principalement à l'intérieur des cellules végétales. Ces récepteurs vont détecter les protéines de virulence délivrées par les agents microbiens, appelées effecteurs. Les effecteurs des agents microbiens agissent souvent en contournant la MTI, facilitant ainsi la colonisation de l'hôte et la maladie (Effector-triggered susceptibility (ETS)). L'activation des NLR entraîne une immunité déclenchée par l'effecteur (ETI, Effector-triggered immunity), qui met fin à la croissance de l'agent microbien. La réponse immunitaire de la plante est largement gouvernée par la voie de l'acide salicylique, la voie de l'acide jasmonique et la voie de l'éthylène (Pieterse *et al.* 2012; Nobori *et al.* 2020). Même si l'induction de ces voies de défense par les agents pathogènes a largement été étudiée dans les phases autotrophes de croissance des plantes, à ce jour, une seule étude s'est intéressée à étudier leur activation pendant les phases hétérotrophes de croissance de la plante (Darrasse *et al.* 2010). En effet, les auteurs de cette étude ont démontré l'absence d'induction de défenses dans les plantules de haricot, après inoculation dans les graines d'agents pathogènes en situation compatible et incompatible. Cette étude a porté sur la mesure de l'induction des voies de défense relatives à l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Darrasse *et al.* 2010). Ainsi l'activation de l'immunité de la plante et des voies de défense impliquées, a principalement été étudiée dans des interactions avec des agents pathogènes. Au contraire, il n'y a que très peu d'informations sur l'action du système immunitaire sur les micro-organismes commensaux (Hacquard *et al.* 2017; Teixeira *et al.* 2019). Ceci pose une question essentielle sur les capacités de la plante à limiter sa colonisation par les agents pathogènes, tout en laissant entrer les organismes commensaux ou bénéfiques pour sa croissance et sa santé.



Quelques études ont montré que l'immunité de la plante pouvait agir sur l'intégralité de la composition du microbiote et pas uniquement sur des organismes pathogènes. Par exemple, des plants d'*A. thaliana* mutés dans la voie de signalisation de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique ou dans la MTI montre un microbiote altéré (Lebeis *et al.* 2015; Chen *et al.* 2020a). Une étude récente a démontré que les micro-organismes commensaux du microbiote racinaire pouvaient supprimer la réponse immunitaire de l'hôte. Cette étude a été réalisée à l'échelle de la communauté et révèle également que la présence de ces micro-organismes supprimeurs d'immunité augmentent la colonisation des non-supprimeurs de l'immunité (Teixeira *et al.* 2021). D'un point de vue temporel, le développement du système immunitaire est corrélé au développement de la plante. En effet, l'efficacité du système immunitaire de la plante va augmenter à partir des stades précoces de développement jusqu'au stade reproductif (Li *et al.* 2020). D'un point de vue spatial, l'immunité de la plante va être plus importante dans les organes qui vont se développer plus tardivement. Par exemple, les rosettes juvéniles, les rosettes adultes et les feuilles caulinaires de plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 8 semaines, présentent d'importantes différences en terme de résistance après l'inoculation d'agents pathogènes bactériens (Hu and Yang 2019).

La plante peut donc réguler son microbiote par son système immunitaire, mais réciproquement, le microbiote joue un rôle dans l'établissement et la maturation du système immunitaire de la plante (Vannier, Agler and Hacquard 2019). En accord avec cette hypothèse, des plantes qui se sont développées dans un environnement axénique, donc exemptes de communautés microbiennes, montrent une déficience au niveau de l'expression des gènes de défense et des voies de signalisation hormonale, après inoculation sur les feuilles de l'agent pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Kremer 2017; Kremer *et al.* 2021). Dans la même idée, une autre étude a montré l'importance des communautés microbiennes bactériennes commensales dans la résistance face à des agents fongiques et des oomycètes inhibiteurs de la croissance d'*A. thaliana* (Durán *et al.* 2018).

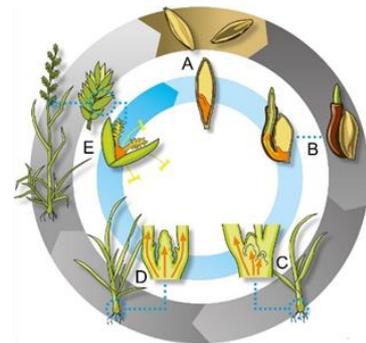
A.



B.



C.



**Figure 14 : Voies de transmission horizontale et verticale des micro-organismes. A.** Transmission horizontale, médiée principalement par les micro-organismes de l'air et du sol (Bulgarelli *et al.*, 2013). **B.** Transmission verticale clonale (Vannier *et al.*, 2019) et **C.** Transmission verticale par la graine (d'après Gagic *et al.*, 2018).

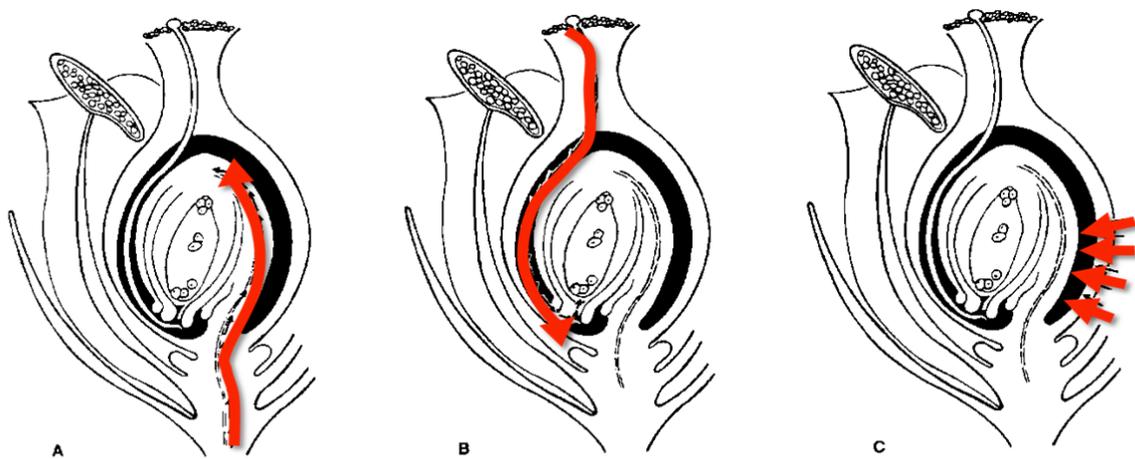
#### IV. Transmission du microbiote à et par la graine

Nous avons pu voir précédemment (cf : partie « III. a. », Sources d'inoculum des plantes), que la transmission du microbiote peut se faire par une voie horizontale, résultant d'un transfert de micro-organismes à partir de l'environnement (**Figure 14A**). Cependant une transmission verticale est aussi possible, et va correspondre à une transmission de micro-organismes de la plante mère à sa descendance. La transmission horizontale contrairement à la transmission verticale, prend une place beaucoup plus importante dans l'acquisition des micro-organismes par la plante (Leff *et al.* 2017).

La transmission par la voie verticale, implique la transmission d'un micro-organisme ou d'une communauté microbienne sur plusieurs générations. Cette héritabilité du microbiote a son importance en agronomie car elle va permettre de moduler le microbiote de la plante entre les générations de plantes (Wei and Jousset 2017). Chez les plantes deux types de reproductions s'opèrent permettant une transmission entre générations à deux vitesses (**Figure 14B et C**).

Dans le cas de la reproduction asexuée, la plante peut être considérée comme un organisme modulaire, ou chaque organe (ex : propagule, bouture, tubercule...) peut redonner un nouvel individu. De ce fait, il a été proposé qu'un échange de micro-organismes se réalisait au sein du réseau des plantes clonales (Stuefer, Gómez and Mølken 2004). Une étude portant sur la plante clonale *Glechoma hederacea* a montré qu'une cohorte de micro-organismes bactériens et fongiques était héritée de la plante mère à ses plantes filles *via* les stolons (Vannier *et al.* 2018). La transmission de micro-organismes par reproduction clonale a été à ce jour moins étudiée que celle réalisée par reproduction sexuée.

La transmission des membres du microbiote par les graines a été explorée chez un grand nombre de plantes d'intérêt agronomique (Barret *et al.* 2015; Rezki *et al.* 2018; Escobar Rodriguez *et al.* 2019; Rodríguez *et al.* 2019). Par exemple chez le maïs, les semences d'hybrides de maïs génétiquement apparentées possèdent des taxons bactériens similaires (Liu *et al.* 2012). Dans la même idée, Johnston-Monje and Raizada (2011) ont montré la présence des mêmes genres microbiens dans plusieurs génotypes de maïs, y compris chez son ancêtre la téosinte. Chez le riz, environ 45% des communautés bactériennes associées aux graines sont retrouvées sur deux générations successives (Hardoim *et al.* 2012). Une méta-analyse du microbiote de la rhizosphère du maïs, a permis également d'identifier des taxons héréditaires (Walters *et al.* 2018). Des études plus récentes portant sur des espèces de *Brassicaceae* ont montré par des approches de



**Figure 15 : Les voies de transmission des micro-organismes aux graines.** Les micro-organismes pour atteindre la graine peuvent utiliser 3 voies de colonisation. **A.** La voie interne, résultant d'une infection par le système vasculaire. **B.** La voie florale permettant le passage des micro-organismes par le style de la fleur ou encore **C.** La voie externe résultant d'un contact par le fruit, les résidus de culture ou l'environnement extérieur (d'après Maude *et al.*, 1996).

métabarcoding la transmission d'une part du microbiote, entre des générations de plante successives (Rezki *et al.* 2018; Rochefort *et al.* 2019). Enfin, les travaux de Rodríguez *et al.* (2019), indiquent qu'au cours des générations les graines qui se sont développées dans un environnement axénique montrent une diminution de leur diversité et de leur richesse microbiennes. Cette étude démontre une hérédité importante du microbiote des graines, mais elle démontre aussi que cette transmission est soumise à une dérive des taxons microbiens au cours du temps en l'absence d'inoculum environnemental.

Dans cette section, la transmission des micro-organismes à et par les graines sera détaillée. Cette transmission sera décrite en en deux étapes : (i) la transmission de la plante-mère à la graine et (ii) la transmission de la graine à la plantule.

#### a. De la plante-mère à la graine

La transmission de micro-organismes à et par la graine peut être définie en trois voies principales, (i) interne, (ii) florale ou (iii) externe (**Figure 15**) (Maude 1996). Globalement, la colonisation précoce des graines en développement se fait par la voie interne *via* le xylème ou les tissus non vasculaires de la plante mère (Shade, Jacques and Barret 2017). Cette voie de transmission interne des micro-organismes aux graines est limitée, car ils doivent surmonter une importante sélection par les tissus de la plante (**cf : partie « III. d. », La sélection par l'hôte**). Outre cette première voie de colonisation, les graines en développement peuvent être colonisées par la voie florale *via* le stigmate de la plante mère (Maude 1996). L'étude des voies de transmission permet d'établir la position des micro-organismes dans les tissus de la graine. Par exemple, les voies de transmission interne et florale peuvent aboutir à la colonisation de tous les tissus de la graine, de l'embryon aux téguments, selon les micro-organismes analysés (Shade, Jacques and Barret 2017). En revanche, la colonisation tardive des graines matures sera plus influencée par la voie externe. C'est le contact de la graine avec les micro-organismes présents sur les fruits ou les résidus de culture (Wuest, Albrecht and Skirvin 2000) qui va permettre cette colonisation externe. Cette voie de transmission va principalement permettre une colonisation par les micro-organismes des téguments de la graine voire uniquement de leur surface (Singh and Mathur 2004b). Comme cette voie externe est plus permissive que les voies interne ou florale, les assemblages microbiens associés à la surface de la graine sont plus nombreux et plus diversifiés que ceux associés aux tissus internes de la graine (Nelson 2018).



## i. Transmission par la voie interne

Les micro-organismes endophytes peuvent se déplacer dans les tissus vasculaires de la plante par des phénomènes passifs (évapotranspiration) ou bien par des mécanismes actifs de mobilité, notamment par les flagelles ou les pili chez les bactéries (James *et al.* 2002; Compant *et al.* 2005; Wadhwa and Berg 2021).

La transmission de micro-organismes à la graine par la voie interne a fait l'objet de nombreux travaux qui ont principalement concerné des agents pathogènes. Ainsi, *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* a la capacité de coloniser la graine de manière intra et intercellulaire pendant son développement (Tanco *et al.* 2013). Ou encore, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (*Xcf*) est transmissible de manière vasculaire aux graines de haricot (Darsonval *et al.* 2009). Dans cette seconde étude, les auteurs ont détecté sur les graines l'agent pathogène *Xcf*, après l'avoir inoculé par aspersion sur les feuilles en prenant soin de recouvrir les parties florales afin de cibler uniquement une transmission interne. Par mutagenèse dirigée de gènes cibles de *Xcf* suivie de l'inoculation des mutants sur haricots, l'importance des adhésines ou encore du système de sécrétion de type III a ainsi été démontré dans la transmission aux graines par la voie vasculaire (Darsonval *et al.* 2008, 2009). Il existe également des exemples de transmission de micro-organismes bénéfiques ou commensaux aux graines. Un exemple connu est le champignon endophyte, *Ėpichloë* transmis à la graine (Gagic *et al.* 2018). Par des approches de microscopie confocale, *Ėpichloë* exprimant la CFP a pu être identifié dans les tissus vasculaires de la plante, ainsi que dans les graines, émettant l'hypothèse de sa transmission par la voie interne (Liu, Nagabhyru and Schardl 2017).

## ii. Transmission par la voie florale

Comme vu précédemment, les fleurs sont composées d'un ensemble de micro-habitats comme le nectar, les pétales, le pistil, le pollen et fruit qui contiennent une diversité importante de micro-organismes (Alekkett, Hart and Shade 2014). La transmission des micro-organismes à la graine par la voie florale est initiée par l'entrée des micro-organismes par le pistil puis par le micropyle de l'ovaire. Dissocier les voies de transmission internes et florales peut être difficile dans le cas des micro-organismes endophytes car ceux-ci peuvent coloniser les tissus de la fleur puis de la graine, soit par le funicule (interne), soit par le micropyle (florale) de l'ovaire. Cependant, l'étude de la transmission par la voie florale, peut être estimée par l'inoculation de micro-organismes marqués, sur des fleurs isolées. Par exemple, les bactéries *Xanthomonas campestris*



*pv. campestris* ou *Acidovorax avenae* ssp. *avenae*, inoculées respectivement sur les fleurs de choux et de pastèques, sont abondamment détectées au niveau des graines (Lessl, Fessehaie and Walcott 2007; van der Wolf *et al.* 2019). Plus récemment, la transmission par la voie florale de *Pseudomonas syringae* *pv. actinidae* a pu être démontrée après son inoculation sur les fleurs de kiwi. Cette bactérie a été détectée au sein du stigmate, sur toute la longueur de son style, ainsi que dans les tissus de l'ovaire (Donati *et al.* 2018). Au-delà de ces exemples d'organismes pathogènes, la transmission par voie florale d'un organisme bénéfique pour la croissance de la plante a également été documentée avec la souche *Paraburkholderia phytofirmans* PsJn (Mitter *et al.*, 2017).

Les micro-organismes transmis par voie florale peuvent être issus de différentes sources d'inoculum comme le pollen (Manirajan *et al.* 2016), les insectes florivores (McCall and Irwin 2006) ou encore les pollinisateurs (Prado *et al.* 2019). Les insectes associés aux fleurs vont être vecteurs d'une diversité de micro-organismes et vont donc influencer non seulement la composition microbienne des fleurs mais également le microbiote des graines (Aizenberg-Gershtein, Izhaki and Halpern 2013; Ushio *et al.* 2015; McFrederick *et al.* 2017; Prado *et al.* 2019).

### iii. Transmission par la voie externe

La colonisation par la voie externe se met en place majoritairement lorsque la graine a atteint le stade mature. Elle peut se produire sur la plante mère par une contamination primaire venant d'un contact entre le fruit et la graine. Par exemple, une étude révèle à travers des analyses de microscopie, que le champignon *Alternaria brassicicola* une fois inoculé sur les siliques d'*A. thaliana* peut atteindre les graines après pénétration par les jonctions cellulaires, les fentes de déhiscence ou encore les stomates (Pochon *et al.* 2012). En parallèle, chez les bactéries, *Clavibacter michiganensis* peut se transmettre par la voie externe en colonisant les craquelures de fruit de tomate (Tancos *et al.* 2013). La principale voie de transmission des micro-organismes par la voie externe s'effectue néanmoins par contact passif entre les graines et les micro-organismes lors de la récolte ou après celle-ci.

En conclusion, des micro-organismes associés à des voies de transmission spécifiques, soit interne, florale ou externe. Mais en réalité, un micro-organisme peut employer plusieurs de ces voies de transmission à la graine et il peut être assez difficile de conclure sur la voie de transmission majoritairement utilisée (Darsonval *et al.* 2009; Dutta *et al.* 2012; Tancos *et al.* 2013).



## b. De la graine à la plantule

La graine est colonisée par un ensemble de micro-organismes, mais leur présence ne garantit pas leur transmission à future plantule (Barret *et al.* 2015). En effet, de nombreuses modifications de l'habitat graine vont s'opérer lors de la germination. La germination débute par une phase d'imbibition des tissus de la graine et se termine lors de la sortie de la radicule (Bewley 1997). Pendant cette phase de germination, les tissus passent d'un état sec (environ 10 % de teneur en eau) à un état hydraté (Nelson, 2004). De nombreux composés vont être relargués au voisinage de la graine, créant une zone d'intense compétition microbienne, la spermosphère (Nelson 2004; Schiltz *et al.* 2015). La plantule va ensuite se développer jusqu'à percer le sol et atteindre l'atmosphère, c'est ce qu'on appelle l'émergence. Cette étape établit le début de l'autotrophie de la plante. C'est à partir de cette étape que va majoritairement se différencier le microbiote des parties aériennes et racinaires de la plante (Abdelfattah *et al.* 2021; Kim and Lee 2021).

Pendant la germination et l'émergence, il va y avoir des changements drastiques dans la composition du microbiote de la graine (Ofek, Hadar and Minz 2011; Yang *et al.* 2017; Torres-Cortés 2018). Ces changements sont dus aux modifications de l'état de la plante, mais également à la coalescence des communautés de micro-organismes associés aux graines et au sol. La coalescence des communautés correspond à la rencontre et au mélange entre deux ou plusieurs communautés. Elle peut être désignée comme symétrique, si chacune fusionne de manière équilibrée, ou dans le cas contraire, comme asymétrique (Rillig *et al.* 2015; Castledine *et al.* 2020). Dans le cas de la graine en germination il va y avoir un fort apport en micro-organismes par le sol, la coalescence va donc être asymétrique. En effet, les travaux de Rochefort *et al.* (2021) montrent que seulement 0,3% à 15% de la diversité en micro-organismes retrouvés sur la plantule de colza provient de la graine contre 35 à 72% du sol. Les auteurs expliquent cette asymétrie par un effet de masse (Shmida and Wilson 1985) dû à une plus forte population et diversité de taxons associés au sol en comparaison des graines. Au-delà de cet important apport par le sol, une partie du microbiote est tout de même transmis de la graine à la plantule et cela a été démontré chez un certain nombre de familles botaniques différentes (Green *et al.* 2006; Ofek, Hadar and Minz 2011; Barret *et al.* 2015; Leff *et al.* 2017; Yang *et al.* 2017; Torres-Cortés 2018). Cette part transmise relève cependant de micro-organismes initialement rares ou sous-dominants dans le microbiote de la graine (Rochefort *et al.* 2021). Ceci peut être expliqué par les changements drastiques d'environnement (ex : changements de pH, concentration en nutriments et en métabolites



secondaires, stress osmotique), qui peut lever la dormance ou l'état viable non cultivable des taxons rares sur les graines et favoriser ainsi leur croissance (Shade *et al.* 2014). Dans la graine certaines bactéries à l'état viable mais non cultivable (Oliver 2005; Jiang *et al.* 2016) pourraient ré-émerger, si la disponibilité en nutriments leur devient favorable. Par la modification des ressources disponibles pour les micro-organismes dans le milieu lors de la germination et l'émergence, la plante sélectionne des taxons copiotrophes (Torres-Cortés 2018). Au-delà du changement dans la composition nutritionnelle de l'environnement, il a été démontré que le microbiote des graines ne semblait pas impacter les défenses immunitaires de la plantule. En effet, chez le haricot l'inoculation sur la graine d'un agent microbien en situation compatible, *Xanthomonas citri* pv. *phaseoli*, ou incompatible, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* n'induit pas de défenses chez la plantule (Darrasse *et al.* 2010). L'assemblage du microbiote de la graine à la plantule est également dépendant de déterminants génétiques spécifiques associés aux taxons transmissibles. Ces déterminants vont permettre aux taxons de s'adapter aux changements de conditions de l'habitat graine à l'habitat plantule. Ainsi, l'adhésion, la résistance au stress osmotique, la quorum-sensing ou encore la sécrétion d'effecteurs sont des déterminants importants dans la transmission bactérienne (Darsonval *et al.* 2008, 2009; Pochon *et al.* 2012; Johnson and Walcott 2013; Tian *et al.* 2015). Au-delà de ces exemples, l'identité des déterminants microbiens associés à une transmission efficace de la graine à la plantule ne sont que peu compris et vont devoir être plus rigoureusement étudiés dans les années à venir.

La transmission des micro-organismes de la graine à la plantule passe principalement par la détection de la présence des mêmes taxons dans les deux compartiments. Ces résultats coïncident avec un transfert vertical de micro-organismes endophytes par les semences, qui ne peut cependant pas être clairement confirmé, car ces travaux ne sont pas réalisés sur un même individu (Gagne-Bourgue *et al.* 2013; Lopez-Velasco *et al.* 2013; Kim and Lee 2021). Quelques études ont pu démontrer une réelle transmission de taxons de la graine à la plantule. Par exemple, Ferreira *et al.* (2008) ont démontré que *Pantoea agglomerans* marquée à la GFP, une fois inoculée sur graine pouvait être ré-isolée sur plantule. Cependant aucune étude à ce jour ne s'y est intéressée à l'échelle d'une communauté.



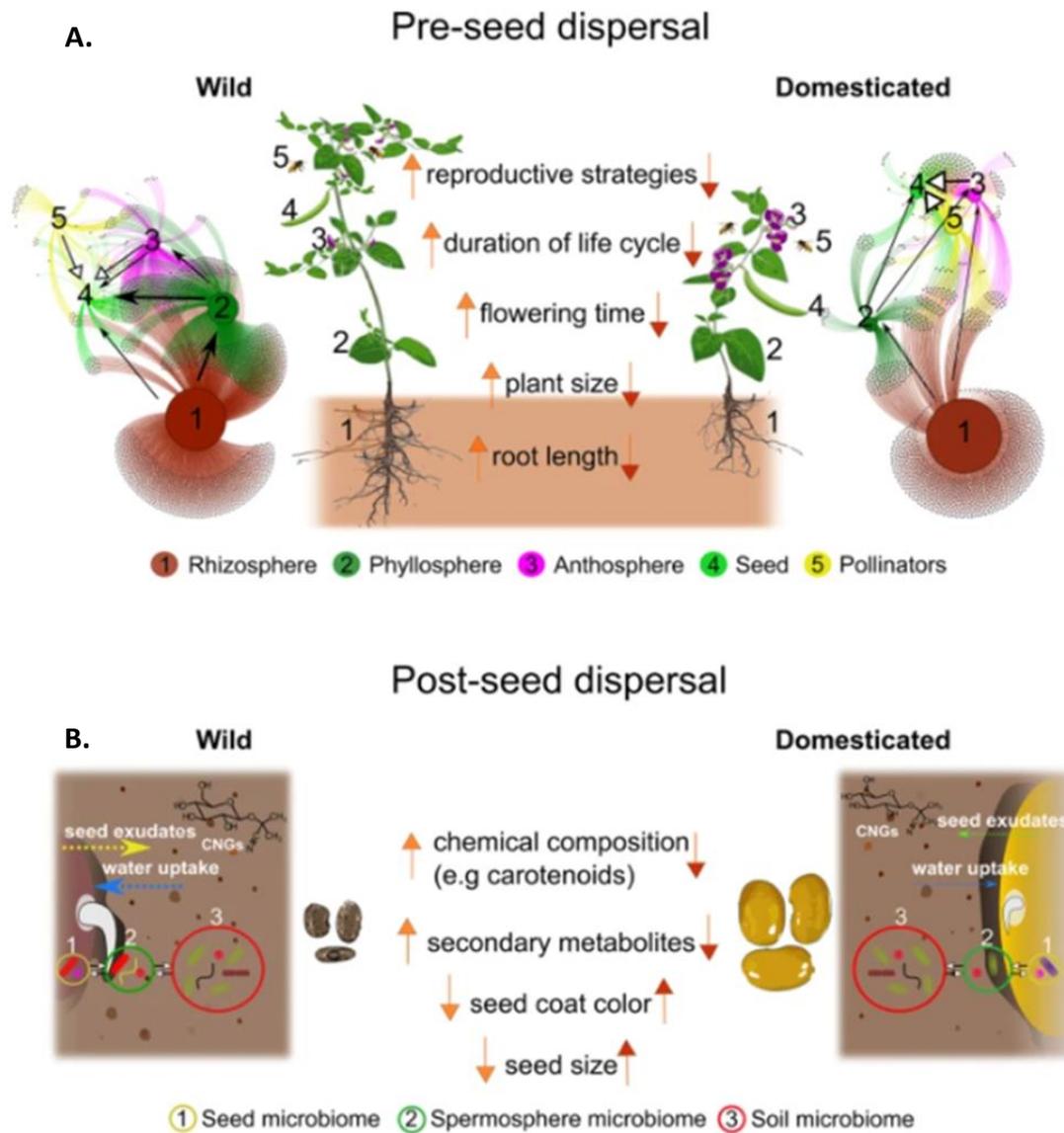
## V. Pilotage du microbiote des graines

Deux approches peuvent être développées pour piloter efficacement le microbiote des plantes, la première est la biostimulation. Elle consiste à moduler le microbiote de la plante en prenant en compte le lieu de production, les itinéraires techniques mais également le génotype de la plante. Cependant, dans un agrosystème perturbé, une deuxième approche peut être mise en place, c'est le biocontrôle. Elle consiste à l'introduction de micro-organismes ou de consortia microbiens sur les plantes afin de rétablir efficacement la diversité microbienne et améliorer la santé et/ou la croissance des plantes.

### a. La biostimulation

Le lieu de production ou encore les itinéraires techniques sont des facteurs qui vont fortement influencer le microbiote des plantes. Par exemple, l'apport en fertilisants, en pesticides, le labour, les propriétés du sol, de l'air ou encore de l'eau d'irrigation vont moduler les communautés microbiennes associées à l'environnement et aux plantes (Bamdad *et al.*; Ikeda *et al.* 2011; Hartman *et al.* 2018; Bodenhausen *et al.* 2019; Patanita *et al.* 2020). La comparaison de parcelles conduites en système conventionnel, biologique et sans labour a montré que les communautés microbiennes du sol varient selon ces pratiques agricoles (Banerjee *et al.* 2019). Les associations de cultures impactent la composition des communautés microbiennes du sol et sélectionnent un microbiote favorisant la minéralisation des nutriments et la croissance des plantes (Rodríguez-Echeverría, Lozano and Bardgett 2016). Ainsi, la meilleure compréhension de l'impact de ces facteurs sur la dynamique du microbiote, permettra de diriger les conduites culturales vers une modulation du microbiote dans le but de promouvoir la santé et la croissance des plantes.

Le génotype de la plante influence également la composition du microbiote (**cf : partie « III. d. », La sélection par l'hôte**) et doit donc être pris en compte dans des objectifs de biostimulation. En effet, la domestication des plantes a impacté les traits de nombreuses plantes cultivées et ainsi leur microbiote associé (Pérez-Jaramillo, Mendes and Raaijmakers 2016). Un très bon exemple est le lien établi entre la domestication du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*), les traits morphologiques de ses racines et des communautés de *Rhizobacteriales* associées aux racines (Pérez-Jaramillo, Mendes and Raaijmakers 2016). Comme les racines, les graines ont subi de nombreux changements phénotypiques et métaboliques du fait de la domestication (ex : taille, couleur, composition chimique ou encore excrétion de métabolites secondaires) et ces



**Figure 17 : Impact de la domestication sur les caractéristiques des plantes conduisant à des modifications dans la composition des communautés microbiennes**

**A. Impact de la domestication avant dispersion des semences :** Les changements phénotypiques causés par la domestication des plantes affectent à la fois les compartiments souterrains et aériens de la plante. Chez les plantes sauvages, la connectivité microbienne entre l'environnement et les compartiments de la plante, visualisée sous la forme d'un réseau microbien bipartite, pourrait refléter un degré plus élevé de transmission verticale des micro-organismes vers les graines de la plante (représentée par des flèches noires plus larges), sous l'influence des mécanismes de contrôle du microbiote de l'hôte. Ainsi, il est supposé que les plantes domestiquées présentent des différences dans la connectivité microbienne par rapport à leurs homologues sauvages.

**B. Impact après la dispersion des graines :** Les changements phénotypiques causés par la domestication des plantes peuvent affecter la dynamique spatiale et temporelle des interactions plantes-microbes dans la spermosphère. Les plantes sauvages ont des graines de plus petites tailles et des couleurs de la testa différentes des graines provenant de plantes domestiquées. L'absorption d'eau peut être négativement corrélée à la taille de la graine ou des pores de la graine et la couleur de la graine est liée aux caractéristiques morphologiques du testa de la graine influençant le taux d'imbibition. La dynamique de la germination, de l'imbibition et de l'exsudation des graines diffère de celle des plantes domestiquées (d'après Soldan *et al.*, 2021).

changements peuvent impacter le microbiote de la plante (**Figure 17**) (Soldan *et al.* 2021). La domestication a augmenté la diversité des micro-organismes sur les graines et diminué les interactions entre ces micro-organismes (Abdullaeva *et al.* 2021). Ces perturbations du microbiote peuvent jouer en défaveur ou en faveur de la plante, du fait de l'importance du microbiote sur la physiologie de la plante et sur de nombreux traits impliqués dans la croissance et la santé de la plante (Wei and Jousset 2017).

Ainsi, utiliser la sélection variétale pour moduler le microbiote des plantes serait possible. En effet, suite à une longue évolution, les plantes possèdent des déterminants génétiques leur permettant de sélectionner en partie leur microbiote (Delaux and Schornack 2021). Avec le concept émergeant d'holobionte (cf : **partie « II. b. », Impact du microbiote sur la croissance et la santé des plantes**), le microbiote offre une nouvelle source génétique héritable qui implique que la plante peut être agronomiquement plus performante par la sélection variétale et par conséquent, la sélection de son microbiote (Sessitsch and Mitter 2015; Gopal and Gupta 2016). Ainsi, la sélection de plantes excréant des exsudats spécifiques permet de recruter des taxons supprimant la présence d'agents pathogènes (Bakker *et al.* 2012). Pour les graines, il a été proposé de sélectionner des plantes excréant des exsudats de graines spécifiques ou encore ayant des fleurs avec des caractéristiques morphologiques particulières afin de sélectionner les micro-organismes qui y sont associés (Berg and Raaijmakers 2018). Cependant, la complexité du microbiote, l'importance des processus stochastiques dans l'assemblage du microbiote par rapport au processus de sélection, ainsi que les connaissances encore limitées sur les mécanismes permettant à une plante de contrôler les communautés microbiennes qui lui sont associées, font qu'il est, à ce jour, difficile de prévoir la transmission et la fonction du microbiome dans les prochaines générations.

## b. Le biocontrôle

L'une des alternatives à la biostimulation est le biocontrôle par l'inoculation de taxons microbiens sur les plantes, dans le but de moduler le microbiote des plantes (Compant *et al.* 2019). A ce jour, des criblages de souches ayant une activité de lutte biologique ont été réalisés majoritairement en conditions contrôlées, et ces résultats sont souvent difficiles à reproduire en conditions agronomiques. L'une des approches prometteuses est de cibler directement l'incorporation de micro-organismes dans les graines. En effet, les micro-organismes sont peu nombreux dans les graines (Newcombe 2018) et s'établiront en premier sur la future plante (Shade, Jacques and Barret 2017). Il serait ainsi plus facile d'y intégrer un inoculum microbien, en



comparaison à une plante mature qui possède un microbiote préexistant qu'il faudrait d'abord supprimer pour que l'inoculum puisse s'installer (Bulgarelli *et al.* 2015; Dal Cortivo *et al.* 2018). Cependant, à ce jour, les inoculants microbiens restent difficiles à incorporer sur les semences et à maintenir efficaces dans le temps. En effet, les souches actuellement inoculées sur plantes ne sont pas systématiquement isolées de l'habitat ciblé et peuvent présenter des déficits d'adaptation à ce milieu. C'est pourquoi une meilleure compréhension de l'écologie et de l'assemblage du microbiote des plantes est nécessaire pour contourner ces problématiques.

Albright *et al.* (2021), ont défini trois leviers pour contourner les barrières empêchant l'établissement des inoculants microbiens. Le premier levier est la pression de propagule, qui consiste à optimiser à la fois la dose et la fréquence d'application des inoculants pour optimiser leur installation dans la graine. L'hérédité du microbiote peut être en effet plus importante si les organes sont densément peuplés étant donné que de faibles populations vont augmenter les effets stochastiques d'assemblage des communautés (Gao *et al.* 2020). Par exemple, une étude a démontré qu'une concentration minimale de bactéries du genre *Xanthomonas* sur les graines était nécessaire pour qu'elles soient transmises à la plantule (Darrasse *et al.* 2007). Le deuxième levier face au filtre environnemental, consiste à sélectionner des taxons qui sont adaptés à l'habitat dans lequel on veut les inoculer. Dans le cas de la graine, il faut, notamment, des taxons capables de résister aux stress osmotiques (Pochon *et al.* 2012). Étudier les origines et les voies de transmission naturelles des micro-organismes aux graines va également être essentiel afin d'intégrer de manière efficace l'inoculum aux graines. Enfin, dans un troisième temps il est nécessaire que les taxons inoculés puissent résister aux stress biotiques, et ne pas être inhibés par des taxons indigènes présentant des traits de compétition par interférence ou exploitation des ressources (cf : partie « III. c. », **Interactions inter-microbiennes**). Par exemple, une forte compétition entre les micro-organismes va s'installer dans la spermosphère (Nelson 2004), de la même manière pendant la germination et l'émergence, la plantule va sélectionner les taxons les plus aptes à utiliser les composés nutritifs relâchés (Torres-Cortés 2018).

A ce jour, l'ingénierie du microbiote des plantes doit prioriser ses recherches sur plusieurs points. Le premier point repose sur le fait que les études devront de plus en plus s'intéresser à l'impact de communautés microbiennes complexes plutôt qu'à l'étude de l'impact d'un unique micro-organisme (Vorholt *et al.* 2017). Par exemple, des bactéries inoculées individuellement sur plantes n'ont pas d'impact sur la croissance de la plante, alors qu'elles vont l'améliorer lorsqu'elles sont inoculées en communauté (Durán *et al.* 2018). Dans un second temps, il est également



nécessaire de ne pas simplement analyser les changements fonctionnels dus à l'application d'un inoculum mais également de savoir si l'inoculum se maintient sur la plante dans le temps, sans impacter l'environnement (Albright *et al.* 2021). En effet, il peut s'avérer qu'une absence d'effet peut simplement être due à l'absence de l'installation de l'inoculum. Enfin dans un troisième temps, une meilleure compréhension de la dynamique temporelle des changements fonctionnels est nécessaire. En effet, les études portent généralement sur quelques points temporels mais ne mesurent pas l'impact immédiat ou tardif de l'inoculum sur la plante (Albright *et al.* 2021).

Appliqué au microbiote des semences, l'ensemble de ces points nécessitent d'identifier (i) l'origine des taxons associés aux graines, (ii) les processus d'assemblage du microbiote de la graine, et sa dynamique lors de la germination-levée et (iii) les compositions de communautés microbiennes présentant des propriétés bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes. Au-delà de ma thèse, il sera également nécessaire de développer des approches technologiques innovantes afin d'incorporer efficacement les communautés synthétiques ou les produits de ces communautés dans les semences. Cette inoculation pourra être dirigée de deux manières, soit sur le porte-graine en adaptant par exemple la technologie EndoSeed (Mitter *et al.* 2017), soit par le développement de nouvelles techniques de traitement des semences, comme l'enrobage des semences. Par exemple, il est possible de réaliser ces enrobages par nano-encapsulation lipidique ou par injection dans les tissus de la graine mature (Seedjection, <http://seedjection.at>). Des efforts de recherche constants se mettent en place pour développer ces technologies avec des systèmes innovants. Il a très récemment été développé par KWS et l'université technologique de Graz, un système de conservation des micro-organismes bénéfiques en microbilles appliqués ensuite aux semences. Développé sur betterave ce système va être commercialisé d'ici 2022.



## VI. Objectifs de la thèse

Cette thèse est organisée autour de deux grands objectifs :

- Le premier objectif a visé à ***améliorer la compréhension de l'assemblage du microbiote des graines et de sa dynamique lors des phases de germination-levée***. Plus précisément, en étudiant :
  - **L'origine du microbiote des graines (chapitres 1 et 2)**. Le but étant d'identifier les principales sources d'inoculum primaire de la graine.
  - **La dynamique d'assemblage du microbiote des graines pendant leur développement (chapitres 1 et 2)**. Le but étant d'évaluer l'importance relative des différents processus écologiques lors de la succession de ces communautés pendant le développement de la graine.
  - **La dynamique du microbiote des graines lors des étapes précoces de développement de la plantule (chapitre 2)**. En effet, un taxon retrouvé sur la graine ne se transmet pas forcément à la plantule. L'objectif a également été d'évaluer les modulations du phénotype de la plantule en réponse à des différences de composition du microbiote de la graine.
  - **L'identification de déterminants génétiques importants dans l'assemblage du microbiote des graines (chapitre 3)**. Le but étant d'identifier des déterminants génétiques impliqués dans une transmission efficace des bactéries de la graine à la plantule.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons principalement utilisé des approches écologiques par des analyses de profils de communautés microbienne et l'utilisation de modèles d'écologie (**chapitres 1 et 2**). Des approches plus fonctionnelles ont également été mises en place et reposent sur la génomique comparative, la qPCR et le RB-Tnseq afin d'identifier des déterminants génétiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines (**chapitre 3**).

- Le deuxième objectif a été ***d'identifier des taxons bactériens isolés du microbiote des graines ayant des propriétés inhibitrices de l'agent pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris****. Pour ce second objectif nous avons utilisés des approches de microbiologie, RB-TnSeq, transcriptomiques, génomiques et métabolomiques (**chapitre 4**).



# CHAPITRE 1

*Assemblage du microbiote pendant le  
développement de la graine*



## I. Introduction

### a. Contexte

Les semences agissent comme un vecteur de dispersion des plantes mais aussi de dispersion de la diversité de micro-organismes qui leur est associée. Ces micro-organismes transmis à et par les semences peuvent être bénéfiques (Goggin *et al.* 2015; Cope-Selby *et al.* 2017), néfastes (Tancos *et al.* 2013; Darrasse *et al.* 2018), ou neutres pour la future plante. Dans un contexte de diminution, voire d'abandon progressif de l'utilisation des produits phytosanitaires appliqués en traitement aux semences, le pilotage de la composition du microbiote des graines à des fins d'amélioration de la qualité sanitaire des graines est une alternative innovante à ces traitements.

Déployer des stratégies d'ingénierie du microbiote en traitement des semences nécessite d'identifier les taxons microbiens fréquemment associés à cet habitat. La composition du microbiote des semences variant entre les espèces de plantes (Barret *et al.* 2016; Simonin *et al.* 2021), il est nécessaire de cibler l'identification des taxons microbiens à l'échelle de l'espèce végétale d'intérêt. A ce jour, la structure taxonomique du microbiote des graines matures d'une cinquantaine d'espèces végétales a été caractérisée (Simonin *et al.* 2021). Cependant, les processus d'assemblage de ces communautés microbiennes lors des phases de développement de la graine ne sont que très peu documentés. Une meilleure compréhension de ces processus d'assemblage est néanmoins importante afin d'estimer (i) l'ordre d'arrivée des membres du microbiote et (ii) les voies de colonisation employées par ces micro-organismes (Maude 1996). En effet, ces processus vont conditionner les modes et/ou le timing d'application des inocula microbiens.

### b. Objectifs et stratégies

L'objectif principal de ces travaux était **d'étudier l'assemblage du microbiote des graines au cours des phases de développement des graines de deux espèces distinctes : le radis et le haricot**. En effet, la structure du microbiote des graines matures de radis et de haricot est très bien caractérisée (Barret *et al.* 2015; Klaedtke *et al.* 2016; Rezki *et al.* 2016; Torres-Cortés *et al.* 2018). Par ailleurs, le mode de pollinisation de ces deux espèces est différent, avec une pollinisation majoritairement autogame pour le haricot et allogame chez le radis. Nous avons échantillonné et analysé par une approche métabarcoding (marqueurs bactériens : ARNr 16S V4 et *gyrB*) la composition microbienne associée à des lots de graines à différents stades du développement de la graine (le remplissage et la dessiccation). Afin de limiter les fluctuations d'inoculum local, les plantes ont été cultivées sur la même parcelle expérimentale (site de la FNAMS – Brain sur



l'Authion) au cours de la même année. Afin d'étudier les voies de colonisation primaires des micro-organismes et le potentiel impact du mode de pollinisation sur la composition du microbiote des graines, nous avons également échantillonné et analysé, par une approche métabarcoding, des lots de fleurs et de fruits provenant des plantes de la même parcelle.

Dans une seconde partie nous avons cherché à **étudier les déterminants génétiques bactériens nécessaires à la transmission pendant le développement de la graine**. Pour cela nous avons comparé la prévalence des déterminants bactériens associés aux populations bactériennes majoritairement retrouvées sur (i) les graines et sur (ii) les fleurs et les fruits. Cette approche de génomique comparée permet d'avoir un premier aperçu des éléments génétiques bactériens potentiellement impliqués dans une transmission aux graines.

#### c. Contribution des auteurs à ce travail

Dans ces travaux, j'ai réalisé les analyses métabarcoding, la production des figures et la rédaction de l'article, conjointement avec Matthieu BARRET et Marie-Agnès JACQUES. Gloria TORRES-CORTES, Anne PREVEAUX et Armelle DARRASSE ont participé à la récolte des échantillons. Anne PREVEAUX a réalisé l'ensemble de la collection d'isolats des échantillons de haricot et de radis. Les banques d'amplicons ont été réalisées par Coralie MARAIS et le plateau ANAN (SFR QUASAV). Ashley SHADE (Michigan State University) et Gloria TORRES-CORTES ont aidé aux analyses métabarcoding. L'ensemble des auteurs a participé à l'édition et à la révision du manuscrit ci-dessous, publié dans FEMS Microbiology Ecology en 2020.



## II. Résultats



FEMS Microbiology Ecology, 96, 2020, fiae190

doi: 10.1093/femsec/fiae190

Advance Access Publication Date: 23 September 2020  
Research Article

## RESEARCH ARTICLE

## Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation

Guillaume Chesneau<sup>1</sup>, Gloria Torres-Cortes<sup>1</sup>, Martial Briand<sup>1</sup>,  
Armelle Darrasse<sup>1</sup>, Anne Preveaux<sup>1</sup>, Coralie Marais<sup>1</sup>, Marie-Agnès Jacques<sup>1</sup>,  
Ashley Shade<sup>2</sup> and Matthieu Barret<sup>1,\*</sup>,<sup>†</sup>

<sup>1</sup>IRHS-UMR1345, Université d'Angers, INRAE, Institut Agro, SFR 4207 QuaSaV, 49071, Beaucouze, France and

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Program in Ecology, Evolutionary Biology, and Behavior, The DOE Great Lakes Bioenergy Research Center, and The Plant Resilience Institute, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

\*Corresponding authors: IRHS, 42 rue Georges Morel, 49071 BEAUCOUZE, France. Tel: +33 2 41 22 57 16; E-mail: [matthieu.barret@inrae.fr](mailto:matthieu.barret@inrae.fr)

One sentence summary: Bacterial dynamics during seed development.

Editor: Angela Sessitsch

<sup>†</sup>Matthieu Barret, <http://orcid.org/0000-0002-7633-8476>

### ABSTRACT

Seed microbiota acts as a starting point for the assembly of the plant microbiota and contributes to successful plant establishment. To date, the order and timing of microbial taxa immigration during seed development and maturation remained unknown. We investigated the temporal dynamics of seed bacterial communities in bean and radish. A high phylogenetic turnover was observed for both plant species with few taxa associated with all seed developmental stages. Greater heterogeneity in communities structure within each stage was observed for radish. While, about one-third of radish seed bacterial taxa were detected in buds, flowers and fruits, very few taxa seem to be transmitted by the floral route in bean. In the latter species, bacterial populations belonging to the *P. fluorescens* species complex were found either in buds, flowers and fruits or in seeds. The relative phylogenetic proximity of these bacterial populations combined with their habitat specificity led us to explore the genetic determinants involved in successful seed transmission in bean. Comparative genomic analyses of representative bacterial strains revealed dozens of coding sequences specifically associated with seed-transmitted strains. This study provided a first glimpse on processes involved in seed microbiota assembly, which could be used for designing plant-beneficial microbial consortia.

**Keywords:** seed microbiota; community assembly; bacterial transmission; *Phaseolus vulgaris*; *Raphanus sativus*

### INTRODUCTION

Plants host diverse communities of microorganisms, which can impact plant fitness. Part of the plant microbiota is transmitted from one plant generation to the next via seeds (Shade, Jacques and Barret 2017). Although the exact number of plant-associated taxa acquired through seeds is difficult to estimate, numerous cases of seed transmission have been reported. Historically, most of the documented cases of seed transmission

have been related to plant pathogens because this represents an important route for pathogen dispersion and is therefore important for plant diseases emergence (Baker and Smith 1966). For instance, *Acidovorax citrulli*, an important pathogen of watermelon can reach a 100% seed to seedling transmission rate (Dutta *et al.* 2012). Another well-described example of seed transmission concerned symbiotic fungi of the genus *Epichloë*, that produce bioactive alkaloids, which protect plant against

Received: 8 August 2020; Accepted: 17 September 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. All rights reserved. For permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



herbivores but ultimately impact livestock health (Gagic et al. 2018). Finally, diversity surveys of seed microbial communities have detected many bacterial and fungal phyla across seeds of various plant families including *Amaranthaceae* (Lopez-Velasco et al. 2013), *Asteraceae* (Leff et al. 2017), *Cucurbitaceae* (Adam et al. 2018), *Brassicaceae* (Links et al. 2014; Rezki et al. 2016; Rybakova et al. 2017; Rochefort et al. 2019), *Fabaceae* (Klaedtke et al. 2016; Sánchez-López 2018; Gao et al. 2019), *Poaceae* (Links et al. 2014; Yang et al. 2017; Escobar Rodriguez et al. 2020) and *Solanaceae* (Bergna et al. 2018; Chen et al. 2020).

Changes in composition of the seed microbiota can impact plant fitness, notably by modification of seed vigor. For example, decrease of bacterial richness within *Setaria viridis* seeds leads to a reduction in their germination rate (Escobar Rodriguez et al. 2020). Moreover, correlation between seed microbiota composition and germination speed of *Brassica napus* was also recently highlighted (Rochefort et al. 2019). Variation in seed microbiota composition may also influence the structure of plant-associated microbial communities through priority effects, which correspond to the order and timing of species immigration during community assembly (Fukami 2015). For instance, composition of seed microbial community can modify colonization of wheat roots by dark septate endophytes, three weeks following germination (Ridout et al. 2019). Owing to such effects, managing seed microbiota composition is a promising avenue to improve plant growth and health. For example, floral inoculation of the plant-growth beneficial bacterial strain *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN can favor its vertical transmission to the next plant generation and increase ear emergence of wheat (Mitter et al. 2017).

Incorporation of plant-beneficial microorganisms within seeds by inoculation of microbial endophytes, requires a good knowledge of the seed transmission pathways employed by these microorganisms. Based on previous works performed with plant pathogenic agents, three main transmission routes have been described: (i) a systemic pathway through hilum infection, (ii) a floral pathway by the stigma, or (iii) an external pathway by contact between the seed and fruits or threshing residues (Maude 1996). For example, *A. citrulli* uses the floral pathway to colonize watermelon seeds (Lessl, Fessehaie and Walcott 2007), as well as several *Xanthomonas* species to colonize *Brassica* or bean seeds (Darrasse et al. 2018; van der Wolf et al. 2019). Other bacteria, such as *Clavibacter michiganensis* can either use systemic or external pathways (Tanco et al. 2013). The genetic determinants required for successful seed transmission remain mostly unknown. The type 3 secretion system (T3SS) and the adhesins PilA and FhaB involved in transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds (Darsonval et al. 2008, 2009), are the only determinants identified to date as required for seed transmission.

Deployment of a microbiota-based solution within seed to improve plant growth and health, requires a deeper understanding of the biological and ecological processes involved in the assembly of the seed microbiota. While some studies have focused on the dynamics of the seed microbiota during germination and emergence (Barret et al. 2015; Yang et al. 2017; Torres-Cortés et al. 2018), the dynamic of microbial communities during seed development is currently unknown. The main objective of this study was therefore to investigate the order and timing of microbial taxa immigration during two key phases of seed development: seed filling (i.e. accumulation of storage compounds) and seed maturation (i.e. loss of water content; Verdier, Leprince and Buitink 2019). A total of two species were chosen as study models, common bean (*Phaseolus vulgaris*) and radish (*Raphanus sativus*) since extensive characterization of their seed microbiota

was previously performed (Barret et al. 2015; Klaedtke et al. 2016; Rezki et al. 2016, Rezki et al. 2018; Torres-Cortés et al. 2018).

## MATERIALS AND METHODS

### Site description and sampling of radish and bean

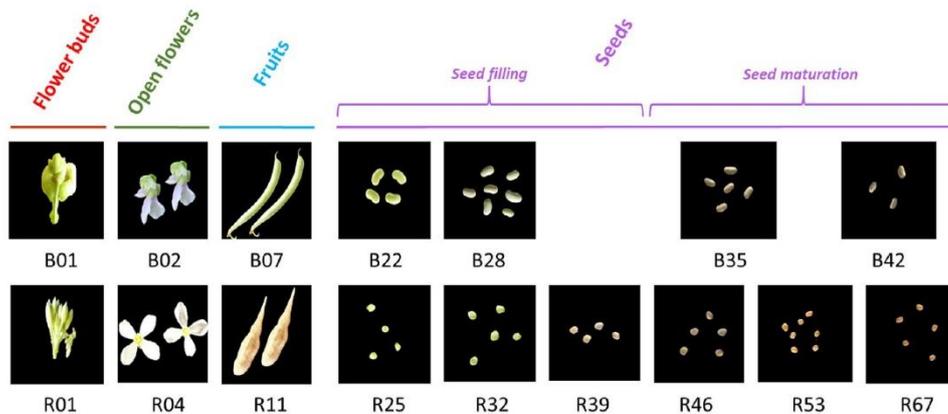
Common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Flaverit) and radish (*Raphanus sativus* L. var. Flamboyant5) were grown in 2016 at the experimental station of the National Federation of Seed Multipliers (FNAMS, 47°28'012.42"N-0°23'44.30"W, Brain-sur-l'Authion, France). The two plant species were grown in separate blocks (5 m × 10 m), at a density of eight bean plants and five radish plants per square meters. Bean and radish seeds (kindly supplied by Vilmorin-Mikado) were sown at the end of March and May 2016, respectively. Flower buds, open flowers, fruits and seeds were collected weekly until full seed maturity (Fig. 1). More specifically, seeds were aseptically removed from fruits with sterile scalpel and tweezers under a laminar flow hood. Seeds were collected during seed filling (bean: B22, B28; radish: R25, R32 and R39) and seed maturation (bean: B35, B42; radish: R46, R53 and R67), each number corresponds to a number of days after pollination of bean and radish flowers. Since the phases of seed filling and seed maturation take longer for radish, more samples were collected. A total of three independent samples, from three individual plants, were collected at each sampling point. Each sample corresponded to a set of flower buds, open flowers, fruits and seeds (Fig. 1). For each sample, grams of tissues and colonies forming unit (CFU) per gram of sample were measured (Fig. 2A and B).

### DNA extraction and construction of amplicon libraries

The collected biological material was soaked in 2 mL of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)) supplemented with Tween® 20 (0.05% v/v, Sigma-Aldrich) per gram of fresh material. Flowers and fruits were crushed in a lab blender (Stomacher, Mixwel, Alliance Bio Expertise, Guipry (France)) for 1 min. Bean and radish seeds were soaked at 4°C under constant agitation (140 rpm) for 16 h and 2 h 30 min, respectively. The suspensions were centrifuged (6000 × g, 10 min, 4°C) and the resulting pellets were suspended in 200 µL of PBS. A total of 100 µL of suspensions were used for DNA extraction while the other 100 µL were dedicated to microbiological analyses (see 'collection of seed-associated bacteria' subsection).

DNA samples were extracted with the Powersoil DNA kit (Mo Bio Laboratories Inc, Carlsbad (USA)) following the supplier's recommendations. PCR reactions were performed with a high-fidelity Taq DNA polymerase (AccuPrime Taq DNA Polymerase System, Invitrogen, Carlsbad (USA)) using 5 µL of 10X Buffer, 1 µL of forward and reverse primers (*gyrB* [100 µM]; 16S rRNA gene [10 µM]), 0.2 µL of Taq and 5 µL of DNA. A first PCR amplification was performed with the primer sets 515f/806r (Caporaso et al. 2011) and *gyrB*.aF64/*gyrB*.aR553 (Barret et al. 2015) which target the v4 region of 16S rRNA gene and a portion of *gyrB*, respectively. Cycling conditions for 515f/806r were composed of an initial denaturation step 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 at 68°C for 10 min. The cycling conditions for *gyrB*.aF64/*gyrB*.aR553 were as followed: 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 step at 68°C for 10 min. Amplicons were purified with magnetic beads (Sera-Mag, Merck, Darmstadt (Germany)). A second PCR amplification was performed to incor-





**Figure 1.** Experimental sampling. Flower buds (B01 and R01), open flowers (B02 and R04), fruits (B07 and R11) and seeds at two different stages of development, seed filling (B22, B28, R25, R32 and R39) and seed maturation (B35, B42, R46, R53 and R67), were sampled. A total of three replicates corresponding to a bulk of organs from different individual plants were performed at each sampling stage.

porate Illumina adapters and barcodes. PCR cycling conditions were identical for the two molecular markers: a first denaturation 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 with magnetic beads and quantified with the Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen). 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 a MiSeq reagent kit v2 500 cycles (Illumina, San Diego (USA)).

### 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(200, 150), maxN = 0, maxEE = c(1,1), truncQ = 5. Chimeric sequences were identified and removed with the removeBimeraDenovo function of DADA2. Taxonomic affiliations of amplicon sequence variants (ASVs) were performed with a naive Bayesian classifier (Wang et al. 2007) implemented in DADA2. ASVs derived from 16S rRNA gene were classified with the Silva 132 taxonomic training data (silva\_nr.v132.train.set.fa.gz). *gyrB* ASVs were classified with an in-house *gyrB* database available upon request (train.set.gyrB.v4.fa.gz). The datasets supporting the conclusions of this article are available in the ENA database under the accession number [PRJEB38127].

### Microbial community analyses

Microbial community analyses were conducted with Phyloseq version 1.22.3 (McMurdie and Holmes 2013). Sequences derived from 16S rRNA gene that were unclassified at the phylum-level, affiliated to Archaeae, Chloroplasts and Mitochondria were removed. Since the primer set *gyrB*.af64/*gyrB*.aR553 primers can sometimes co-amplified *parE*, a paralog of *gyrB*, the *gyrB* taxonomic training data also contained *parE* sequences. ASVs affiliated to *parE* or unclassified at the phylum-level were removed. Sequences were aligned with DECIPHER version 2.14.0 (Wright 2016) and neighbor joining phylogenetic trees were constructed with Phangorn version 2.5.5 (Schliep 2011).

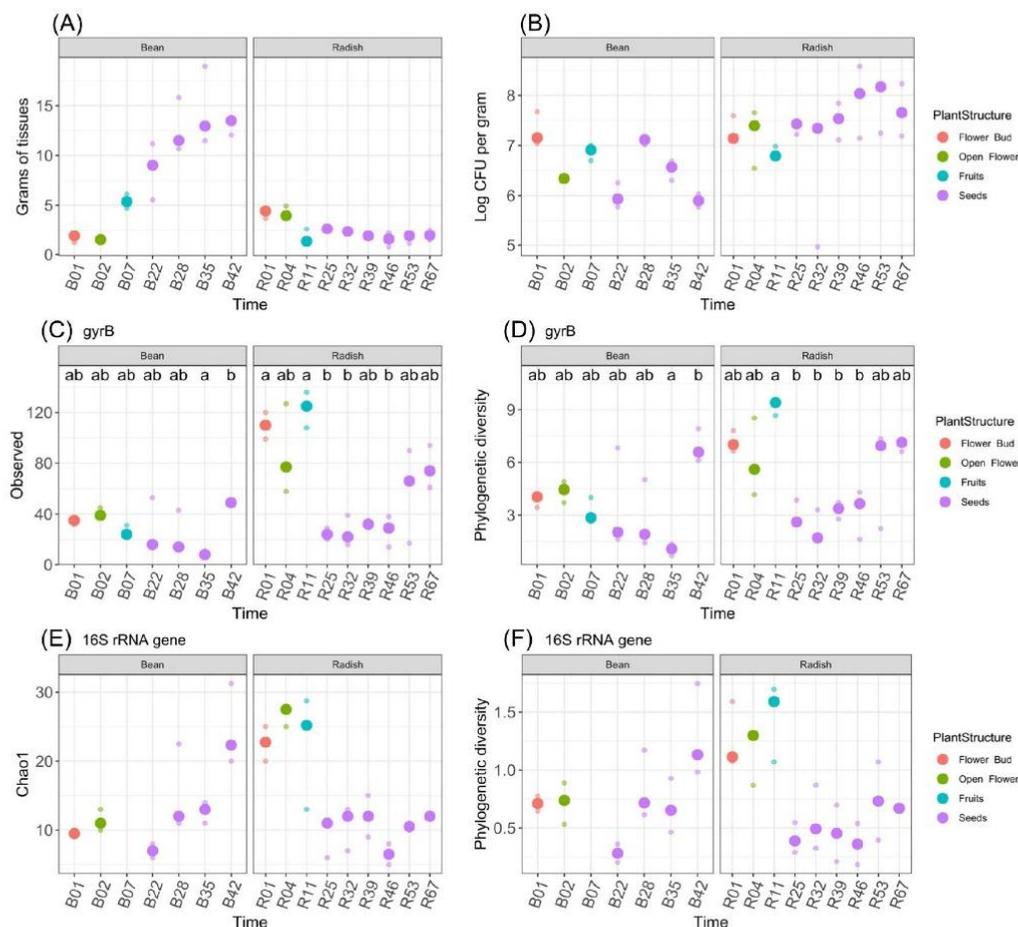
Alpha-diversity metrics were calculated after rarefaction at 44 000 *gyrB* and 1000 16S rRNA gene sequences per sample. Observed richness (number of ASVs) and estimated richness (Chao1 index) were calculated with Phyloseq. Faith's (1992) phylogenetic diversity was calculated with picante version 1.7 (Kembel et al. 2010). Differences in alpha-diversity estimators between stages were assessed with Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance followed by Dunn's post-hoc test. Differences were considered as significant at a  $P$ -value  $\leq 0.05$ .

Changes in phylogenetic membership and composition were measured with unweighted and weighted UniFrac distances (Lozupone and Knight 2005), respectively. Changes in phylogenetic membership were measured with unweighted UniFrac distances, which is sensitive to low-abundant taxa. In contrast we measured changes in composition with weighted UniFrac distances which take into account the relative abundance of each taxa. The relative contribution of seed developmental stages on phylogenetic structure was estimated with canonical analysis of principal coordinates through capscale function of vegan 2.4.2 (Oksanen et al. 2017) followed with permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson 2001). The dispersion of bacterial phylogenetic composition for each sampling stage was monitored with weighted UniFrac distance rather than unweighted UniFrac distance, in order to limit the impact of rare bacterial ASVs. Difference in dispersion between plants species was assessed with Wilcoxon non-parametric test.

Decomposition of phylogenetic turnover (species replacement) and phylogenetic diversity gradient (nestedness) were estimated with the phy.beta.pair function of Betapart version 1.5.1 (Baselga and Orme 2012). On the one hand, phylogenetic turnover (phy.beta.jtu) reflects the proportion of lineages that would be replaced between communities if both communities had the same number of taxa. Phylogenetic turnover was measured through unweighted UniFrac derived pair-wise phylogenetic dissimilarity. On the other hand, phylogenetic diversity gradient (phy.beta.jne) indicated phylogenetic dissimilarity, between communities due to differences in species richness. Phylogenetic diversity gradient was measured as the nestedness-fraction of unweighted UniFrac derived pairwise phylogenetic dissimilarity (Leprieur et al. 2012).

Hierarchical clustering of bacterial ASVs was performed on a subset of ASVs that were detected in at least two samples





**Figure 2.** Temporal diversity of bacterial communities associated with reproductive organs of common bean and radish. (A) Grams of tissues and (B) log CFU monitored for each sample. (C) Observed richness and (D) phylogenetic diversity (Faith's phylogenetic diversity index, Faith 1992) estimated with *gyrB* amplicon sequence variants (ASVs). (E) Estimated richness (Chao1) and (F) phylogenetic diversity estimated with 16S rRNA ASVs. Small light dots represented replicates while large opaque dots represented medians. Letters a and b denoted significant changes between conditions considered at a  $P$ -value  $\leq 0.05$  (Kruskal-Wallis with post hoc Dunn test). No significant differences were observed for (A), (B), (E) and (F).

with a relative abundance  $>0.1\%$ . Hierarchical clustering was performed via cosine similarity of log-transformed ASV counts ( $\log_{10}(x + 1)$ ). Cosine similarity measures the cosine of the angle between two vectors (ASVs) projected in a multi-dimensional space (samples). This measure ignores the magnitude (differences in sequences counts between ASVs) and targets the orientation of the vector. Heatmaps were constructed with pheatmap version 1.0.12 (Kolde 2019) to visualize ASVs co-occurrence. Visualization of phylogenetic tree was done with Interactive Tree of Life version 5.5 (Letunic and Bork 2016). Scripts and data sets employed in this work are available in GitHub: [https://github.com/martialbriand/IRHS\\_EmerSys/blob/master/Chesneau.etal.2020/Chesneau.etal.2020\\_Final.Version.R](https://github.com/martialbriand/IRHS_EmerSys/blob/master/Chesneau.etal.2020/Chesneau.etal.2020_Final.Version.R).

#### Collection of seed-associated bacteria and reconstruction of genomic sequences

Suspension were serial-diluted and plated on 1/10 strength Tryptic Soy Agar (17 g/L tryptone, 3 g/L soybean peptone, 2.5 g/L

glucose, 5 g/L NaCl, 5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 15 g/L agar, Oxoid, Waltham (USA)) supplemented with cycloheximide (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma-Aldrich). After 5 days of incubation at 18°C, colony forming units (CFUs) were counted for each sample. A total of 24 CFUs were randomly picked at each sampling stage, thereby resulting in 180 and 196 bacterial strains for bean and radish, respectively. Molecular typing of each bacterial strain was performed through *gyrB* amplification and subsequent Sanger sequencing (Genoscreen). Strains were associated with ASVs if their *gyrB* sequences were strictly identical (100% identity over 100% of their length) to the ASV sequence.

DNA of 39 bacterial strains representing the most prevalent seed-associated bacterial populations on community sequencing data (Table S1, Supporting Information), were extracted with the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison (USA)). DNA was sequenced with DNBSeg using a PCR free library protocol (BGI). Paired-end reads were assembled with SOAPdenovo version 2.04 (Li et al. 2010) and VELVET version 1.2.10 (Zerbino and Birney 2008). The bacterial strains were



deposited in the CIRM-Plant Associated Bacteria collection ([https://www6.inrae.fr/cirm\\_eng/CFBP-Plant-Associated-Bacteria](https://www6.inrae.fr/cirm_eng/CFBP-Plant-Associated-Bacteria)).

Taxonomic classification of genome sequences was performed through calculation of overall genome relatedness indices. The phylogenetic neighbors were selected from genomes sequences of the NCBI WGS database ( $n = 154\,480$  as of July 2018) with the one2all mode of Kmer-db version 1.6.2 (Deorowicz et al. 2019). Genomes sequences were affiliated at the species level when they shared at least 50% of 15-mers with the genomes of type strains. The percentage of shared 15-mers was also used to investigate the relatedness between the 39 genomes sequences.

Structural and functional annotations were carried out with prokka version 1.2 (Seemann 2014). Orthology assignment was performed with DIAMOND version 0.9.10 (Buchfink, Xie and Huson 2015) on the eggNOG4.5 database (Huerta-Cepas et al. 2016). Orthologous groups (OGs) significantly (Bonferroni adjusted  $P$ -value  $\leq 0.05$ ) associated with seeds were identified with Scoary version 1.6.16 (Brynjildsrud et al. 2016) using a presence/absence table of OGs.

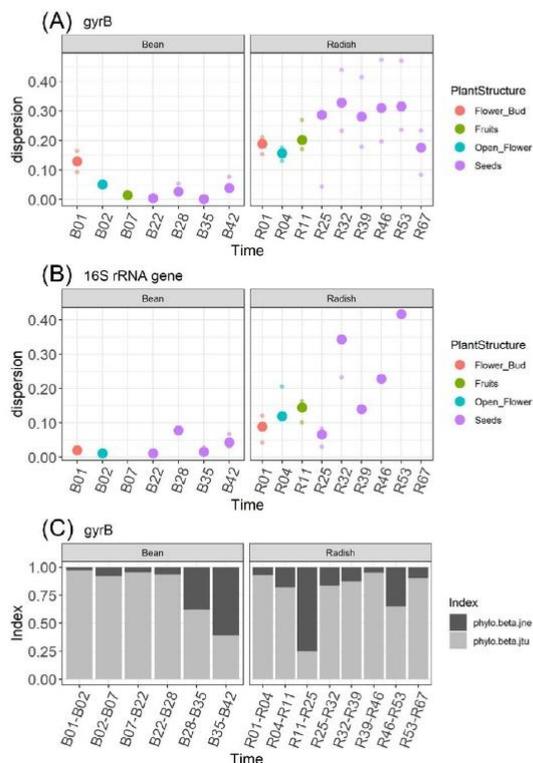
## RESULTS

### Estimation of bacterial community profiles with 16S rRNA gene and *gyrB*

Although the v4 region of 16S rRNA gene (hereafter 16S) is routinely employed in PCR-based surveys of microbial communities, this region has a poor discriminatory power at the species level. To circumvent this limitation, an alternative bacterial marker based on a portion of *gyrB* that encodes the  $\beta$  subunit of the bacterial gyrase was recently developed and employed for estimating the structure of plant-associated bacterial communities (e.g. Barret et al. 2015; Bartoli et al. 2018; Rochefort et al. 2019). To assess the potential amplification bias of *gyrB* primers, we compared the bacterial community profiles estimated with 16S or *gyrB*. A total of four main phyla, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, were consistently detected with both molecular markers (Figures S1A and S1B, Supporting Information). Phyla specifically detected with 16S (e.g. *Chloroflexi*; Figure S1A, Supporting Information) or *gyrB* (e.g. *Nitrospirae*; Figure S1B, Supporting Information) represented ASVs of low prevalence with low sequences counts. According to Mantel test, unweighted UniFrac distances derived from 16S and *gyrB* were moderately correlated ( $R = 0.37$ ; Figure S1C, Supporting Information), while weighted UniFrac distances were highly correlated ( $R = 0.83$ ; Figure S1D, Supporting Information). This reflected differences in detection of ASVs of low abundance. The number of reads per sample was 10- to 100-fold lower with 16S (Figure S1E, Supporting Information) in comparison to *gyrB* (Figure S1F, Supporting Information) as a result of co-amplification of chloroplast and mitochondrial DNA with the primer set that target the v4 region of 16S gene. In the rest of the manuscript, estimates of bacterial diversity are presented with *gyrB* and compared where possible with the 16S dataset.

### Flower to seed dynamics of bacterial communities

A total of 361 and 740 bacterial *gyrB* ASVs were detected on bean and radish samples, while 64 and 84 ASVs were obtained with 16S. However, the variation between replicates within the same sampling stage was important since 15 (4% of *gyrB* ASVs detected in bean) and 42 (6% of *gyrB* ASVs detected in radish) ASVs were



**Figure 3.** Temporal structure of bacterial communities associated with reproductive organs of common bean and radish. Dispersion in bacterial phylogenetic composition (weighted UniFrac distances) at each stage of seed development estimated with *gyrB* ASVs (A) and 16S ASVs (B), respectively. (C) Decomposition of phylogenetic beta-diversity into (i) nestedness (phy.beta.jne; dark gray) and (ii) phylogenetic turnover (phy.beta.jtu; gray), between successive stages sampled. Small light dots represented replicates while large opaque dots represented medians.

associated with all replicates of a sampling stage (Table S1, Supporting Information). With regard to 16S ASVs, a higher percentage of ASVs was systematically detected at each sampling stage (17 ASVs-26% in bean, 24 ASVs-29% in radish, Table S2, Supporting Information). In bean samples, richness and phylogenetic diversity significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) increased at the end of seed maturation with both molecular markers (Fig. 2C–F). These increases in richness and phylogenetic diversity were neither a consequence of the amount of tissue sampled (Fig. 2A) nor an increase in the size of the cultivable bacterial population (Fig. 2B). In radish samples, richness and phylogenetic diversity significantly decreased during the transition from fruit to developing seeds and then remained stable over the course of seed filling and maturation (Fig. 2C–F). This decrease was independent of the amount of tissue sampled or the size of the cultivable population (Fig. 2A and B).

Changes of bacterial communities structure were subsequently monitored by analyzing phylogenetic dissimilarity among all sampled habitats. According to distance from centroid, variation in bacterial phylogenetic composition was significantly lower in bean in comparison to radish for all sampled habitats (Fig. 3A and B). In fact, the bean microbiota was almost exclusively composed of bacterial ASVs affiliated to *Pseudomonadales* whilst the radish microbiota was made up of ASVs related



to *Enterobacterales* and *Pseudomonadales* (Figure S2, Supporting Information). Phylogenetic membership (unweighted UniFrac distance) was significantly ( $P$ -value  $\leq 0.001$ ) impacted in bean and radish by habitat type sampled with both molecular markers (Figure S3, Supporting Information). Overall, habitat type explained 22.0% and 33.6% of variance in bean samples with *gyrB* and 16S sequences and 22.2% and 31.9% in radish samples (Figure S3, Supporting Information). Phylogenetic composition (weighted UniFrac distance) was also significantly impacted by habitat type in bean (95.0% and 45.1% of variance with *gyrB* and 16S sequences) but not in radish (Figure S3, Supporting Information).

To assess whether changes in phylogenetic membership across habitats were driven by phylogenetic turnover or nestedness, we employed a framework initially proposed for assessing spatial turnover of lineages (Baselga and Orme 2012; Leprieur et al. 2012). Changes in beta-diversity between two communities can be attributed to nestedness, which is the acquisition of new members while retaining some original members, or to turnover, which is the replacement of original members with new members. Phylogenetic turnover was the major component of beta-diversity in bean samples (>90%) up to the seed maturation stage where the total amount of phylogenetic beta-diversity became half between turnover and nestedness (Fig. 3C). With respect to radish samples, phylogenetic turnover represented more than 75% of phylogenetic beta-diversity at all stages sampled with the exception of the transition from fruit to developing seeds (R11–R25, Fig. 3C). During this transition nestedness represented 74% of the total amount of phylogenetic beta-diversity.

### Influence of the floral pathway in bacterial seed transmission

To estimate the relative importance of the floral pathway in seed bacterial communities memberships, we measured the number of ASVs detected in buds, flowers and fruits that were associated with seeds. As the *gyrB* read set is composed of a larger number of sequences than the 16S dataset, we used the former for subsequent analyses. Only 10% of the ASVs associated with bean seeds were detected in buds, flowers and fruits. This percentage was more than three times higher in radish, with 36% seeds ASVs detected in buds, flowers and fruits.

To assess whether some groups of ASVs displayed similar changes in their abundances over time a hierarchical clustering based on cosine similarity was performed. Radish-associated taxa were not clustered according to the nature of the habitat sampled (Figure S4, Supporting Information). For instance, we did not detect any taxa specifically associated with radish seeds. However, a set of eight persistent taxa was found at every stage sampled (cluster 3; Figure S4, Supporting Information). These persistent taxa were affiliated to *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia* and *Sphingomonas*. Concerning bean samples, one cluster (cluster 2) was mainly composed of ASVs associated with seeds while another cluster (cluster 4) contained ASVs primarily detected on bud, flower and fruit (Fig. 4).

### Investigation of genetic determinants involved in transmission to bean seeds

Isolation of bacterial strains from buds, flowers, fruits and seeds on a single synthetic media resulted in 180 and 196 isolates in bean and radish, respectively. Of these isolates, 88% and 83% possess 100% identity to ASVs obtained through community

profiling approach. Bean isolates were distributed in 13 ASVs (96.9% of all reads) with a mean of 12 isolates (min 1, max 52) per ASV while 28 ASVs (93.5% of all reads) were associated with radish isolates with a mean of 4 isolates (min 1, max 26) per ASV. A total of 39 isolates representative of the most abundant ASVs (Figure S5, Supporting Information) were selected for whole genome sequencing. These 39 genomic sequences (Table S3, Supporting Information) were clustered according to the percentage of shared  $k$ -mer, resulting in 12 bacterial groups at a 50% threshold (Fig. 5). A total of two groups, related to ASV1 (*Pseudomonas orientalis*) and ASV28 (*Pseudomonas coleopterorum*), both belonging to the *P. fluorescens* subgroup (Hesse et al. 2018), were composed of bean seed-associated taxa (bean cluster 2). Of note, ASV1 group (*P. orientalis*) was composed of genomes sequences derived from bean and radish seed isolates, which suggested no host specificity (Fig. 5).

To assess whether some genetic determinants could be associated with transmission of bacterial taxa to bean seed, a comparative genomic analysis was performed between isolates specifically associated to seeds ASVs (bean cluster 2) and isolates associated with buds, flowers and fruits ASVs (bean cluster 4). Since *Pseudomonadales* represented the main bacterial order detected on bean seeds (Figure S2, Supporting Information), we focused our analysis on *Pseudomonas* isolates associated with bean cluster 2 ( $n = 8$ ) and bean cluster 4 ( $n = 12$ ). A total of four and 12 eggNOG orthologous groups (OGs) were significantly ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) associated with bean cluster 2 and bean cluster 4, respectively (Table 1). The four OGs shared between *P. orientalis* (ASV1) and *P. coleopterorum* (ASV28) were predicted to encode a LysR family transcriptional regulator, a DUF262 domain-containing protein, an aldose 1-epimerase family protein and a sugar major facilitator superfamily (MFS) transporter (Table 1).

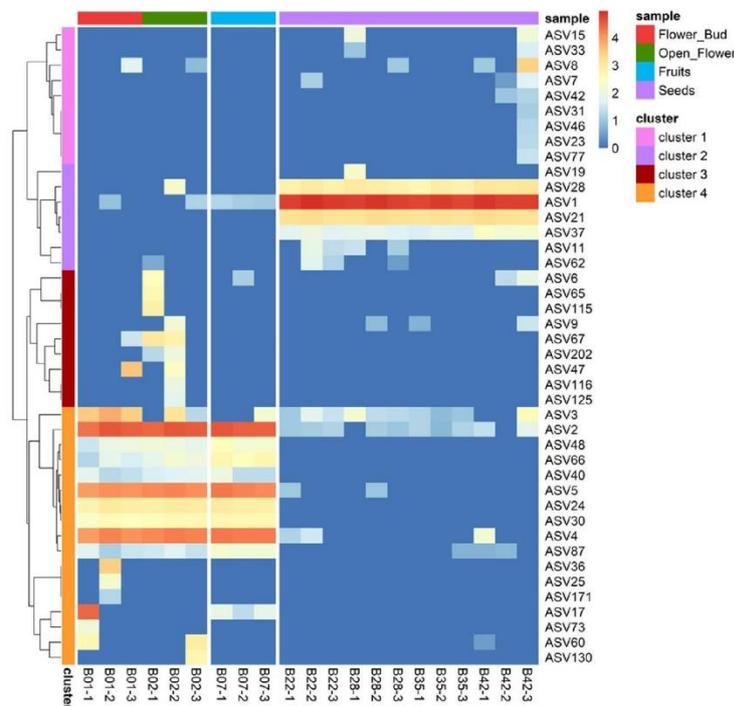
Although *P. orientalis* (ASV1) and *P. coleopterorum* (ASV28) were both detected during bean seed filling and maturation, the former (ASV1) was the dominant taxa of bacterial communities (Fig. 4). The high relative abundance of *P. orientalis* could be potentially related to specific genetic determinants that provided a better fitness. In addition to the four OGs shared with *P. coleopterorum*, 68 OGs were specifically detected in the representative genome sequences ( $n = 6$ ) of *P. orientalis*. According to eggNOG classification approximately 75% of these OGs were associated with proteins of unknown function (Table S4, Supporting Information). Closer inspection of protein sequence similarity through BLASTp searches revealed however that some of these OGs of unknown function were associated with secondary metabolites biosynthetic clusters (B207.01600, B207.01601, B207.01607, B207.01611 and B207.02823) and putative type III effector (B207.02170).

## DISCUSSION

### Origin of seed-associated taxa

According to our sampling, the arrival of bacteria at the early stages of seed development was different between the two plant species investigated. In radish, 36% of the bacterial taxa detected in seeds were also associated with buds, flowers and fruits, therefore suggesting that these taxa were seed-transmitted by the floral pathway. In contrast, taxa associated with bean seed were rarely (~10%) detected on flower and fruit, which could then imply that the systemic pathway is the preferred route of seed transmission. The difference in seed transmission pathways between bean and radish could be





**Figure 4.** Bacterial taxa dynamics during seed development of common bean. Abundant ASVs (>1% in relative abundance) detected in at least two samples were clustered through cosine similarity of log-transformed ASV counts (y-axis). A total of four distinct clusters were highlighted, (i) cluster 1 and 3 for transient ASVs, (ii) cluster 2 for seed-specific ASVs and (iii) cluster 4 for flower/fruit specific ASVs. The different habitats, harvesting days and replicates were represented on the x-axis by different colors: red (buds), green (open flowers), blue (fruits) and purple (seeds). The heatmap color gradient represented the log<sub>10</sub> of read count.

related to their distinct fertilization modes. In common bean, pollination is mainly autogamous with a very low occurrence of cross pollination. Fertilization occurs before the period during which flower open (Frankel and Galun 1977). This pre-anthesis self-pollination could limit the number of micro-organisms that are transmitted through the floral pathway. Although seed transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* has been already reported via this pathway in common bean under controlled conditions (Darsonval et al. 2008; Darrasse et al. 2018), this mode of transmission is probably not widely employed by bacteria in natural setting. In contrast to bean, radish is a self-incompatible annual plant species that relies on anthesis synchrony for successful cross-fertilization. Effective radish reproduction also depends on insect pollinators (Kercher and Conner 1996). During nectar collection, pollinating insects such as small bees and honey-bees (Conner, Sahli and Karoly 2009) deliver microorganisms onto flower (Ushio et al. 2015; Manirajan et al. 2016) and some of these microorganisms are latter incorporated in the seed microbiota (Compant et al. 2011; Prado et al. 2020). Hence, some radish seed-associated taxa detected at the early stage of seed development could be introduced by pollinators.

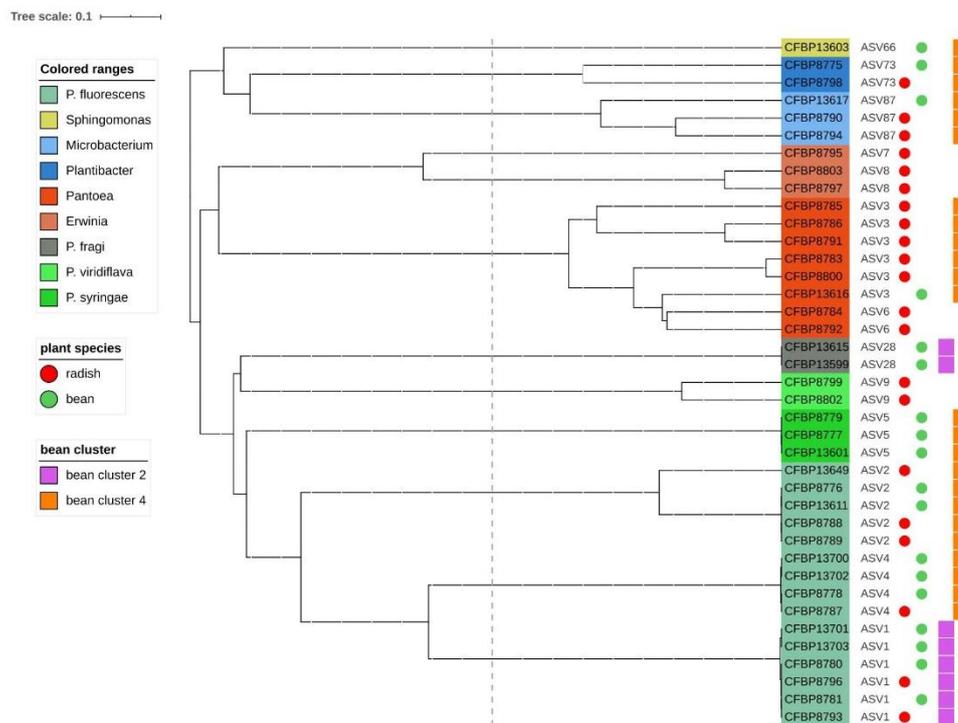
### Dynamics of bacterial communities

Buds, flowers and fruits habitats are associated with high bacterial diversity, which is consistent with previous observations of promotion of bacterial diversity in floral microhabitats such as nectar, stamens and styles (Junker et al. 2011). In contrast, a limited phylogenetic diversity was observed within seed bacterial

communities of both plant species during seed filling and seed maturation. Such observations of low bacteria diversity were observed in previous studies on seeds of various plant species such as *Brassicaceae* (Barret et al. 2015; Rezki et al. 2016), *Poaceae* (Eyre et al. 2019) or *Cucurbitaceae* (Adam et al. 2018). These preliminary findings were in agreement with the hypothesis of a high population bottleneck in seeds (Newcombe et al. 2018) as a result of accumulation of defense compounds within seeds (Mel-dau, Erb and Baldwin 2012) and to the low number of microhabitats associated with the seed (Junker et al. 2011). For instance, bean seed bacterial communities were composed of only four abundant taxa consistently detected during seed development and taxa of low abundance transiently associated with few seed samples. Higher variability of bacterial communities structure was observed on all reproductive organs of radish. This higher variability could be related to a number of plant traits including pollination mode but also plant phenology or plant chemistry.

A significant amount of beta-diversity was associated with phylogenetic turnover during seed filling and seed maturation. Although this taxa turnover is mainly driven by rare taxa that replaced members of the same bacterial order, it does, however, raises the question of their origin. If we cannot rule out the possibility of these taxa being incorporated through the systematic or external pathway during seed development, the most plausible explanation is a limit of the experimental design employed in this work. Indeed, the destructive sampling prevented temporal tracking of bacterial communities within one plant. Since the composition of seed bacterial communities is highly variable between radish plants (Rezki et al. 2018), the important species





**Figure 5.** Overall genome relatedness of bacterial strains. Genome sequences of 39 bacterial strains representing the most abundant ASVs were obtained. The frequency of shared 15-mers between genomes sequences was used as a proxy of genome relatedness. The branch length corresponded to the frequency of shared 15-mers. Branches were colored according to the taxonomic affiliation of each genome sequence. Green and red circles represented bacterial strains isolated from bean and radish, respectively. Bacterial strains associated with bean cluster 2 (seed-associated) and cluster 4 (flower- and fruit-associated) were represented by purple and orange squares, respectively. Dashed line indicates the threshold employed for species delineation (50% of 15-mers, Briand et al. 2019).

**Table 1.** Orthologous groups specifically associated with genome sequences from bean cluster 2 and bean cluster 4.

Group	Locus tag	Functional class	Annotation	Bean cluster 2	Bean cluster 4	P-value
0XP7@NOG	B144_00351	P	TonB-dependent receptor family protein	0	12	0.02
1141G@NOG	B144_00599	S	Hypothetical protein	0	12	0.02
0YHTZ@NOG	B144_00885	E	ABC transporter substrate-binding protein	0	12	0.02
COG2423@NOG	B144_00945	E	Ornithine cyclodeaminase family protein	0	12	0.02
COG3803@NOG	B144_01198	S	DUF924 domain-containing protein	0	12	0.02
0XRNF@NOG	B144_01771	K	AraC family transcriptional regulator	0	12	0.02
11HN1@NOG	B144_02140	S	Hypothetical protein	0	12	0.02
COG2378@NOG	B144_04315	K	YafY family transcriptional regulator	0	12	0.02
0XR7A@NOG	B144_04334	M	Fatty acid cis/trans isomerase	0	12	0.02
0XRA7@NOG	B144_04582	K	LysR family transcriptional regulator	0	12	0.02
COG5281@NOG	B144_04708	S	Phage-related minor tail protein	0	12	0.02
COG4733@NOG	B144_04719	S	Phage-related protein, tail component	0	12	0.02
105ZK@NOG	B207_00203	K	LysR family transcriptional regulator	8	0	0.02
COG1479@NOG	B207_02513	S	DUF262 domain-containing protein	8	0	0.02
0XPUG@NOG	B207_02938	S	Aldose 1-epimerase family protein	8	0	0.02
COG0738@NOG	B207_02939	G	Sugar major facilitator superfamily (MFS) transporter	8	0	0.02

Orthologous groups (OGs) significantly (Bonferroni adjusted P-value  $\leq 0.05$ ) associated with bean cluster 2 (n = 8 genome sequences) and bean cluster 4 (n = 12) were obtained with Scoary. OGs were classified into broad functional categories: Amino acid transport and metabolism (E), Carbohydrate transport and metabolism (G), Transcription (K), Cell wall/membrane/envelope biogenesis (M), Inorganic ion transport and metabolism (P) and Unknown function (S).



turnover observed could be solely due to differences in bacterial community structure between individuals.

In the last stages of seed maturation, an increase of phylogenetic diversity was observed. This increase is independent of the 'true taxa turnover' (Leprieur et al. 2012) reported in the above paragraph since it is related to gain of taxa within communities, which contributed to nestedness. This gain of taxa at late seed maturation could be provided by the external pathway as a result of anatomical changes in fruit structure. Indeed, in the course of fruit maturation, fruit undergo programmed cell death by the action of enzymes inducing walls breakdown and dehiscence of fruits (Meakin and Roberts 1990; Ogutcen et al. 2018). Alternatively, the physiological changes occurring during late seed maturation (Leprince et al. 2017) could also increase the relative abundance of seed-associated taxa that were very rare or even below the detection limit. For instance, the low seed moisture, which corresponded to a water potential of around  $-150$  Mp (Leprince et al. 2017) could favor the growth of bacteria that can tolerate high osmotic stress.

### Genetic determinants of seed transmission in common bean

To date, seed transmission routes have been described for some plant pathogenic bacteria (Darrasse et al. 2018; van der Wolf et al. 2019) but remain unclear for most seed associated bacteria. Seed-transmitted taxa have not only to overcome rapid host physiological changes occurring during seed filling and maturation but also to compete for resources with other microbial populations (Hibbing et al. 2010). Therefore, successful seed transmission required a number of genetic adaptations to overcome these challenges. Our study revealed significant alteration in phylogenetic membership and composition between bean reproductive habitats (buds, flowers, fruits and seeds). Thus, the presence of two clusters of ASVs (i) either associated with bean flowers and fruits but rarely detected on bean seeds or (ii) mainly seed-associated provided an interesting opportunity to identify these determinants through comparative genome analyses. Only four OGs were specifically associated with *P. orientalis* and *P. coleopterorum*, two species detected in bean during seed filling and maturation. This low number of OGs detected in both seed-associated species could indicate that the genetic determinants of seed transmission are not conserved across these species. Two OGs specifically associated with seed isolates, B207\_02938 and B207\_02939 (Table 1), were related to hexose metabolism and transport. If the product of these genes are involved in successful seed colonization, then they may be required during seed embryogenesis when hexose concentration is high (Weber, Borisjuk and Wobus 2005). These initial observations still need to be confirmed with a larger sampling and sequencing of seed-associated bacterial populations.

Given the dominance of *P. orientalis* within seed bacterial communities of bean, the OGs specifically associated with the representative genome sequences of this species were analyzed. Although enrichment of most of these OGs were plausibly explained by shared ancestry, some could be involved in the successful colonization of bean seed. For instance, one protein of unknown function (B207\_02170) shared 28% identity at the C-terminus with the type III effector HopB1 from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. HopB1 perturbs *Arabidopsis thaliana* immune signaling through the cleavage of BAK1, a protein that together with FLS2 are involved in perception of bacterial flagellins (Li et al. 2016). While this type III effector protein is not

present in the genome of *X. citri* pv. *fuscans* CFBP4834-R, a functional T3SS is mandatory for seed transmission of this plant pathogen to bean (Darsonval et al. 2008), which thus indicate that bacteria must circumvent the plant immune system for being seed transmitted. In addition to determinant involved in plant-bacterial interactions, OGs of *P. orientalis* associated with secondary metabolites production could provide a competitive advantage to this bacterial species over other microbial populations. For example, one OG (B207\_02823) was located within a phenazine biosynthetic cluster closely related to *P. orientalis* F9 (Zengerer et al. 2018). Phenazine could increase the competitiveness of *P. orientalis* in nutrient poor environment (such as seed) thanks to its antimicrobial functions (Price-Whelan, Dietrich and Newman 2006; Hibbing et al. 2010).

In conclusion, this study revealed that seed bacterial communities were composed of few dominant taxa that are presented at the early seed filling stages and persisted during maturation. Difference in structure of seed communities between *Phaseolus vulgaris* and *Raphanus sativus* could be related to the seed transmission pathway employed as a result of the plant pollination mode. The mode of pollination is not the only difference between radish and bean seeds, a subsequent analysis must be carried out to answer this question. The dominance of *P. orientalis* within bean seed microbial communities could be due to specific bacterial determinants such as T3 effector and secondary metabolites. Futures works should assess the *in planta* expression of these genetic determinants during seed transmission.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French National Research Agency [ANR-17-CE20-0009-01] and AgreeSkills+ fellowship programme, which has received funding from the EU's Seventh Framework Programme [FP7-609398]. The authors wish to thank Emmanuel Laurent and Vincent Odeau (FNAMS) for field crop management, Jérôme Gouzy (CATI BBRIC) for the genome assembly pipeline and Muriel Bahut (ANAN platform, SFR Quasav) for amplicon sequencing. AS acknowledges support from Michigan State University AgBioResearch (Hatch) and USDA [NIFA-2019-67019-29305].

### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *FEMSEC* online.

**Conflicts of interest.** None declared.

### REFERENCES

- Adam E, Bernhart M, Müller H et al. The *Cucurbita pepo* seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant Soil* 2018;**422**:35–49.
- Anderson MJ. Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Can J Fish AquatSci* 2001;**58**:626–39.
- Baker KF, Smith SH. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 1966;**4**:311–32.
- Bartoli C, Frachon L, Barret M et al.. In situ relationships between microbiota and potential pathobiota in *Arabidopsis thaliana*. *ISME J* 2018;**8**:2024–38.
- Baselga A, Orme CDL. betapart: an R package for the study of beta diversity. *Methods Ecol Evol* 2012;**3**:808–12.

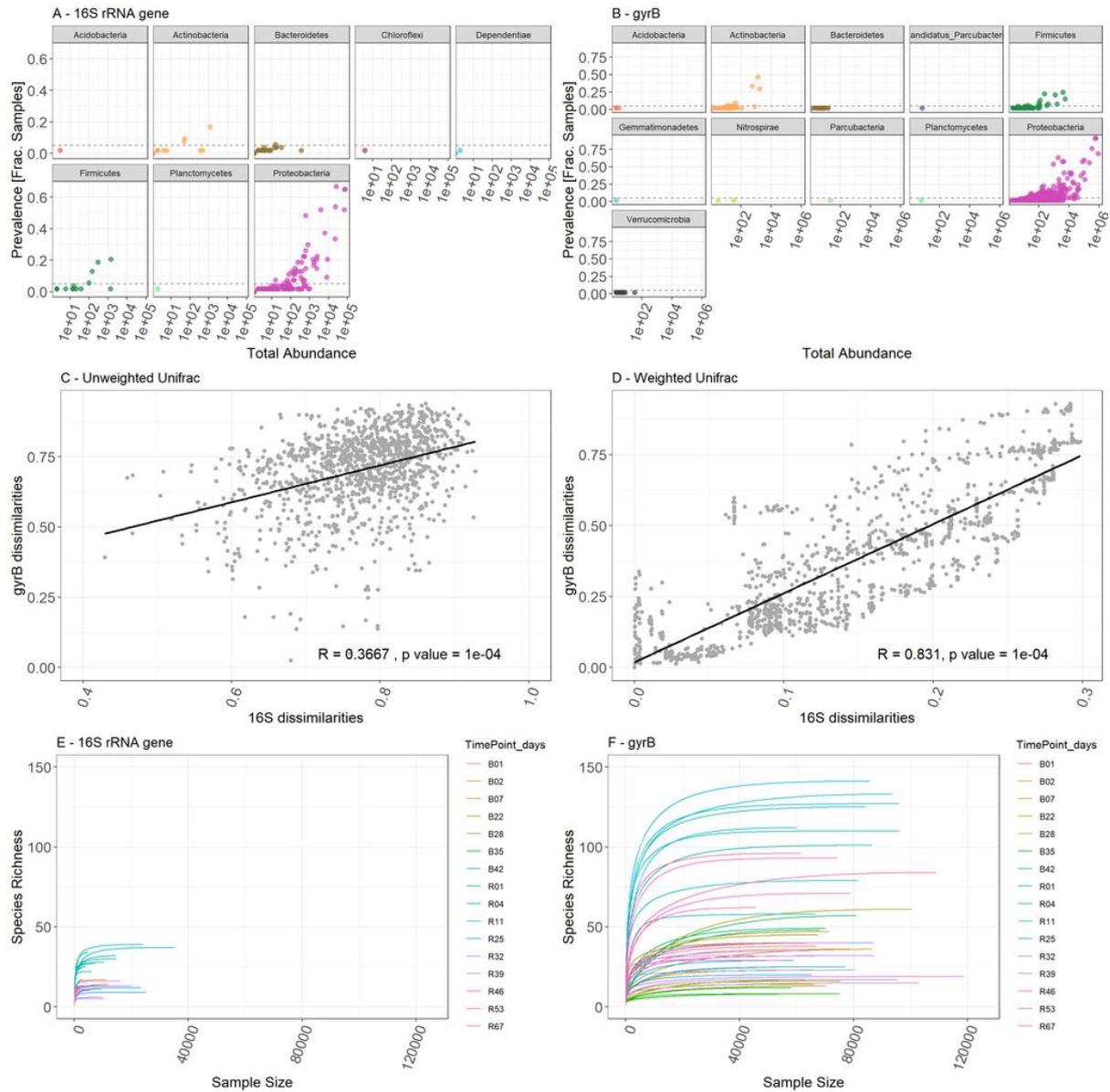


- Bergna A, Cernava T, Rändler M et al. Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes. *Phytobiomes J* 2018;**2**:183–93.
- Briand M, Bouzid M, Hunault G et al. A rapid and simple method for assessing and representing genome sequence relatedness. *bioRxiv* 2019:569640.
- Brynildsrud O, Bohlin J, Scheffer L et al. Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome Biol* 2016;**17**:238.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 2015;**12**:59–60.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016;**13**:581–3.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci* 2011;**108**:4516–22.
- Chen X, Krug L, Yang H et al. *Nicotiana tabacum* seed endophytic communities share a common core structure and genotype-specific signatures in diverging cultivars. *Comput Struct Biotechnol J* 2020;**18**:287–95.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG et al. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol* 2011;**62**:188–97.
- Conner JK, Sahl HF, Karoly K. Tests of adaptation: functional studies of pollen removal and estimates of natural selection on anther position in wild radish. *Ann Bot* 2009;**103**:1547–56.
- Darrasse A, Barret M, Cesbron S et al. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant Soil* 2018;**422**:115–28.
- Darsonval A, Darrasse A, Durand K et al. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol Plant Microb Interact* 2009;**22**:747–57.
- Darsonval A, Darrasse A, Meyer D et al. 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. *Appl Environ Microbiol* 2008;**74**:2669–78.
- Deorowicz S, Gudyś A, Długosz M et al. Kmer-db: instant evolutionary distance estimation. *Bioinformatics* 2019;**35**:133–6.
- Dutta B, Avci U, Hahn MG et al. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. *Phytopathology* 2012;**102**:461–8.
- Escobar Rodriguez C, Antonielli L, Mitter B, Sessitsch A et al. Heritability and functional importance of the *Setaria viridis* L. bacterial seed microbiome. *Phytobiomes J* 2020;**4**:40–52.
- Eyre AW, Wang M, Oh Y et al. Identification and characterization of the core rice seed microbiome. *Phytobiomes J* 2019;**3**:148–57.
- Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv* 1992;**61**:1–10.
- Frankel R, Galun E. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics* 1977;**2**.
- Fukami T. Historical contingency in community assembly: integrating niches, species pools, and priority effects. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2015;**46**:1–23.
- Gagic M, Faville MJ, Zhang W et al. Seed transmission of epichloë endophytes in *Lolium perenne* is heavily influenced by host genetics. *Front Plant Sci* 2018; **9**:1580.
- Gao W, Zheng C, Lei Y et al. Analysis of bacterial communities in white clover seeds via high-throughput sequencing of 16S rRNA gene. *Curr Microbiol* 2019;**76**:187–93.
- Hesse C, Schulz F, Bull CT et al. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environ Microbiol* 2018;**20**:2142–59.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR et al. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:15–25.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K et al. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:D286–93.
- Junker RR, Loewel C, Gross R et al. Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves. *Plant Biol* 2011;**6**:918–24.
- Kemmel SW, Cowan PD, Helmus MR et al. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 2010;**26**:1463–4.
- Kercher S, Conner J. Patterns of genetic variability within and among populations of wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *Am J Bot* 1996;**83**:1416–21.
- Klaedtke S, Jacques M-A, Raggi L et al. Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages: terroir shapes the seed microbiota. *Environ Microbiol* 2016;**18**:1792–804.
- Kolde R. *Pheatmap: Pretty Heatmaps*, 2019.
- Leff JW, Lynch RC, Kane NC et al. Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. *New Phytologist* 2017;**214**:412–23.
- Leprieux F, Albouy C, De Bortoli J et al. Quantifying phylogenetic beta diversity: distinguishing between “True” turnover of lineages and phylogenetic diversity gradients. Shawkey M (ed.). *PLoS One* 2012;**7**:e42760.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S et al. Late seed maturation: drying without dying. *J Exp Bot* 2017;**68**:827–41.
- Lessl JT, Fessehaie A, Walcott RR. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculum dosage and seed infestation. *J Phytopathol* 2007;**155**:114–21.
- Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:W242–5.
- Li L, Kim P, Yu L et al. Activation-dependent destruction of a coreceptor by a *Pseudomonas syringae* effector dampens plant immunity. *Cell Host Microb* 2016;**20**:504–14.
- Links MG, Demeke T, Gräfenhan T et al. Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on Triticum and Brassica seeds. *New Phytol* 2014;**202**:542–53.
- Li R, Zhu H, Ruan J et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res* 2010;**20**:265–72.
- Lopez-Velasco G, Carder PA, Welbaum GE et al. Diversity of the spinach (*Spinacia oleracea*) spermosphere and phyllosphere bacterial communities. *FEMS microbiology letters* 2013;**346**:146–54.
- Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:8228–35.
- Manirajan BA, Ratering S, Rusch V et al. Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environ Microbiol* 2016;**18**:5161–74.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal* 2011;**17**:10–2.



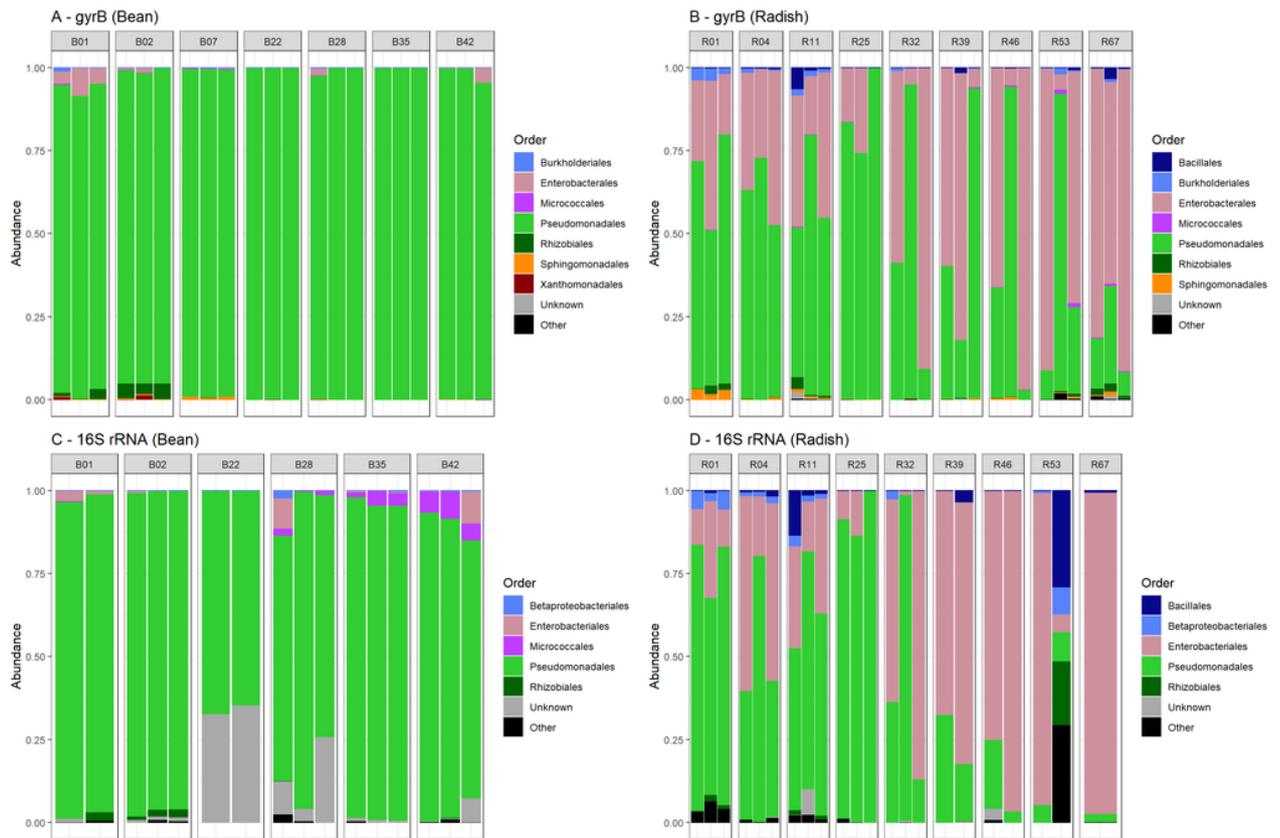
- Maude RB. Seedborne diseases and their control: principles and practice. CAB International. Wallingford, UK, 1996.
- McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;**8**:e61217.
- Meakin PJ, Roberts JA. Dehiscence of fruit in oilseed rape (*Brassica napus* L.) I. ANATOMY OF POD DEHISCENCE. *J Exp Bot* 1990;**41**:995–1002.
- Meldau S, Erb M, Baldwin IT. Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Ann Bot (Lond)* 2012;**110**:1503–14.
- Mitter B, Pfaffenbichler N, Flavell R et al. A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Front Microbiol* 2017;**8**:11.
- Newcombe G, Harding A, Ridout M et al. A hypothetical bottleneck in the plant microbiome. *Front Microbiol* 2018;**9**:1645.
- Ogutcen E, Pandey A, Khan MK et al. Pod shattering: a homologous series of variation underlying domestication and an avenue for crop improvement. *Agronomy* 2018;**8**:137.
- Oksanen J, Blanchet F, Friendly M et al. vegan: Community Ecology Package version 2.5-6 from CRAN ; R. 2019.
- Prado A, Marolleau B, Vaissière BE et al. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Sci Rep* 2020;**10**:1–11.
- Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol* 2006;**2**:71–8.
- Rezki S, Champion C, Iacomi-Vasilescu B et al. Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *PeerJ* 2016;**4**:e1923.
- Rezki S, Champion C, Simoneau P et al. Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant Soil* 2018;**422**:67–79.
- Ridout ME, Schroeder KL, Hunter SS et al. Priority effects of wheat seed endophytes on a rhizosphere symbiosis. *Symbiosis* 2019;**78**:19–31.
- Rochefort A, Briand M, Marais C et al. Influence of environment and host plant genotype on the structure and diversity of the *Brassica napus* seed microbiota. *Phytobiomes J* 2019;**3**:326–36.
- Rybakova D, Mancinelli R, Wikström M et al. The structure of the *Brassica napus* seed microbiome is cultivar-dependent and affects the interactions of symbionts and pathogens. *Microbiome* 2017;**5**:104.
- Schliep KP. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 2011;**27**:592–3.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;**30**:2068–9.
- Shade A, Jacques M-A, Barret M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr Opin Microbiol* 2017;**37**:15–22.
- Sánchez-López AS. Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of *Crotalaria pumila* growing on metal mine residues. *Plant Soil* 2018;**422**:51–66.
- Tancos MA, Chalupowicz L, Barash I et al. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**:6948–57.
- Torres-Cortés G, Bonneau S, Bouchez O et al. Functional microbial features driving community assembly during seed germination and emergence. *Front Plant Sc* 2018;**9**:902.
- Ushio M, Yamasaki E, Takasu H et al. Microbial communities on flower surfaces act as signatures of pollinator visitation. *Sci Rep* 2015;**5**:1–7.
- van der Wolf J, Kastelein P, da Silva Júnior TAF et al. Colonization of siliques and seeds of rapid cycling *Brassica oleracea* plants by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after spray-inoculation of flower clusters. *Eur J Plant Pathol* 2019;**154**:445–61.
- Verdier J, Leprince O, Buitink J. A physiological perspective of late maturation processes and establishment of seed quality in *Medicago truncatula* seeds. The model legume *Medicago Truncatula*. John Wiley & Sons Ltd 2019;44–54.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:5261–7.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. Molecular physiology of legume seed development. *Annu Rev Plant Biol* 2005;**56**:253–79.
- Wright ES. Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. *R Journal* 2016;**8**:352.
- Yang L, Danzberger J, Schöler A et al. Dominant groups of potentially active bacteria shared by barley seeds become less abundant in root associated microbiome. *Front Plant Sci* 2017;**8**:1005.
- Zengerer V, Schmid M, Bieri M et al. *Pseudomonas orientalis* F9: a potent antagonist against phytopathogens with phytotoxic effect in the apple flower. *Front Microbiol* 2018;**9**:145.
- Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 2008;**18**:821–9





**Table S1: Comparison of community profiles estimated with 16S and *gyrB*.** (A and B) Taxonomic composition of bacterial communities estimated with the v4 region of 16S rRNA gene (A) and *gyrB* (B). The prevalence (y-axis) and abundance (x-axis) were reported for each ASV. (C and D) Correlation between unweighted UniFrac distances (C) and weighted UniFrac distances (D) calculated with 16S and *gyrB*. (E and F) Rarefaction curves obtained with 16S (E) and *gyrB* (F).

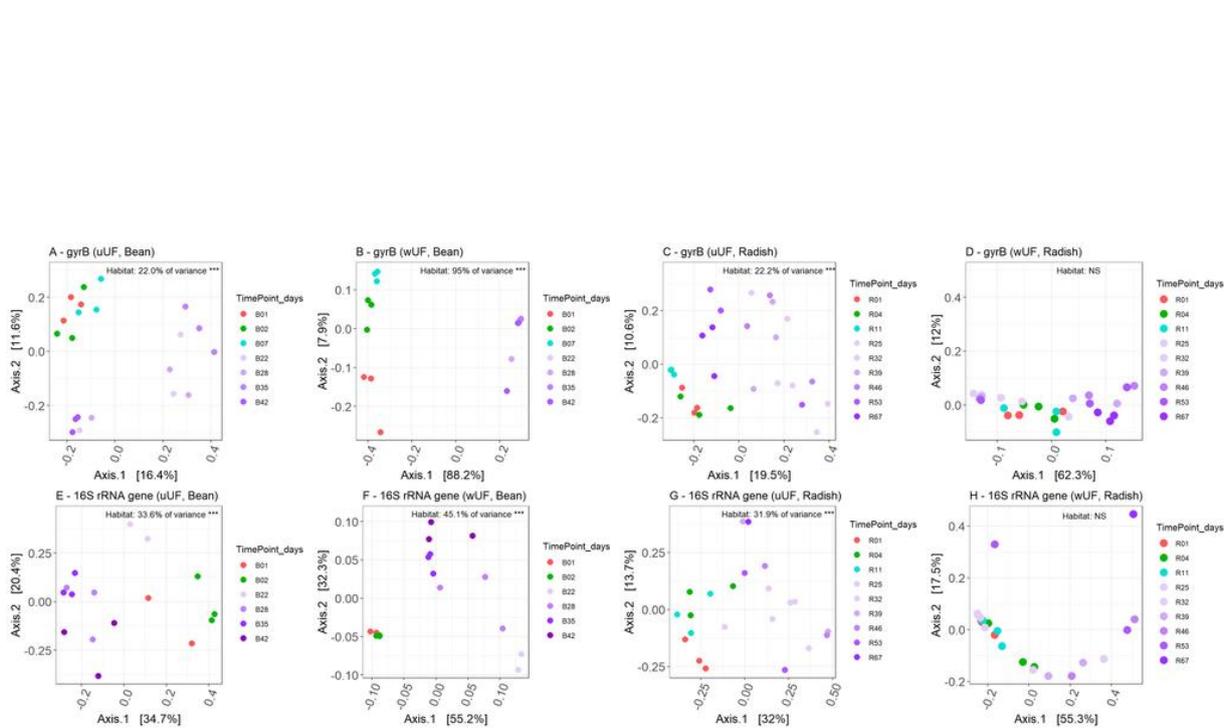




**Figure S2: Taxonomic composition of bacterial communities associated with bean and radish.**

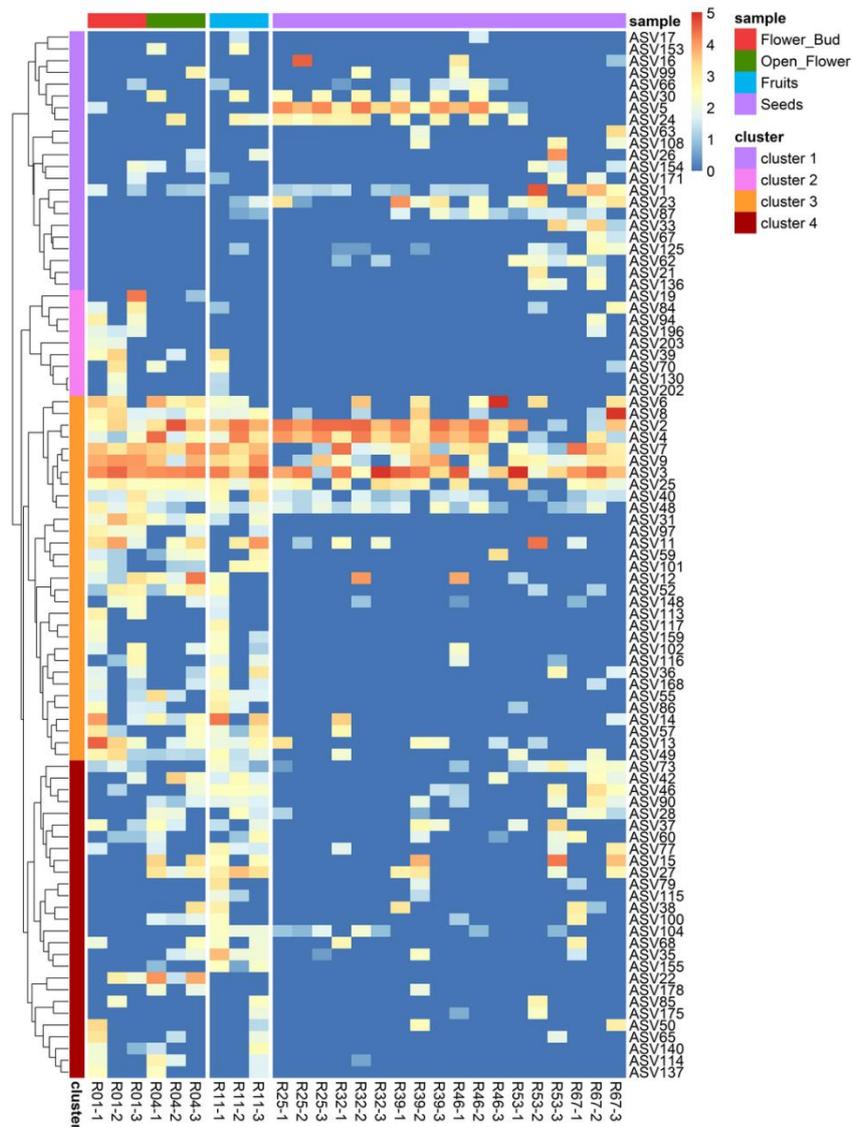
Relative abundance of bacterial orders was estimated with *gyrB* (A and B) and the v4 region of 16S rRNA gene (C and D). Samples were collected from bean (A and C) and radish (B and D).





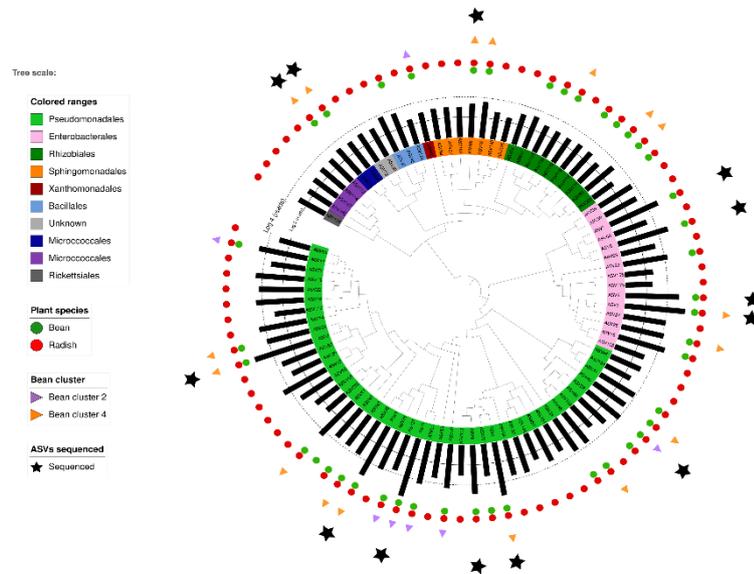
**Figure S3: Similarities in bacterial membership and composition between samples.** Similarities in bacterial membership were estimated with unweighted UniFrac distances *via gyrB* (A and C) and the v4 region of 16S rRNA gene (E and G). Similarities in bacterial composition were estimated with weighted UniFrac distances *via gyrB* (B and D) and the v4 region of 16S rRNA gene (F and H). The relative contributions of the plant reproductive habitats in communities profiles were estimated with PERMANOVA. The percentage of variance explained by habitat type (i.e. buds, flowers, fruits or seeds) were indicated on each plot ( $p$ -value < 0.001).





**Figure S4: Bacterial taxa dynamics during radish seed development.** Abundant ASVs (> 1‰ in relative abundance) detected in at least 2 samples were clustered using cosine similarity of log-transformed ASV counts (y-axis). The different habitats, harvesting days and replicates were represented on the x-axis by different colors, red (buds), green (flowers), blue (fruits) and purple (seeds). The heatmap color gradient represented the log<sub>10</sub> of read count.





**Figure S5: Phylogenetic distribution of bacterial ASVs.** Neighbor-joining tree based on abundant *gyrB* ASVs (>1‰ relative abundance) and detected in at least 2 samples. Branch tips were colored according to the taxonomic affiliation of ASVs at the order level. Black bars represented the relative abundance of each ASV. Green (bean) and red (radish) circles represented the isolation hosts. Purple (cluster 2) and orange (cluster 4) triangles represented ASVs associated to bean cluster. Stars indicated ASVs for which representative bacterial strains were sequenced.



**Table S1: Core ASVs detected per stage with *gyrB*.**

ASV ( <i>gyrB</i> )	Species	B01	B02	B07	B22	B28	B35	B42	Prevalence bean (n=7)	Abundance bean	Isolate bean	R01	R04	R11	R25	R32	R39	R46	R53	R67	Prevalence radish (n=9)	Abundance radish	Isolate radish
ASV1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	.	.	X	X	X	X	X	5	837670	52	.	.	.	X	.	.	.	.	X	2	52652	7
ASV2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X	X	X	X	.	X	.	5	307268	19	X	X	X	X	X	X	X	.	.	7	302918	27
ASV3	<i>Pantoea agglomerans</i>	X	.	.	X	X	X	.	4	17317	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9	546662	30
ASV4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	143282	16	X	X	X	X	X	X	X	.	.	7	197854	16
ASV5	<i>Pseudomonas</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	128851	17	.	.	.	X	X	X	X	.	.	4	104857	2
ASV6	<i>Pantoea agglomerans</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1	118300	12
ASV7	<i>Erwinia persicina</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	X	.	X	X	.	X	X	7	108369	2
ASV8	<i>Erwinia persicina</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	X	.	.	.	.	.	.	3	91815	4
ASV9	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	X	.	.	X	.	X	X	6	81966	6



ASV (gyrB)	Species	B01	B02	B07	B22	B28	B35	B42	Prevalence bean (n=7)	Abundance bean	Isolate bean	R01	R04	R11	R25	R32	R39	R46	R53	R67	Prevalence radish (n=9)	Abundance radish	Isolate radish
ASV11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	.	.	.	.	.	.	.	.	1	50012	4
ASV12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	.	.	.	.	.	.	.	2	45417	4
ASV13	<i>Pseudomonas marginalis</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	.	X	.	.	.	.	.	.	2	41926	5
ASV14	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1	40317	1
ASV17	<i>Pseudomonas lurida</i>	.	.	X	.	.	.	.	1	30215	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0
ASV21	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	.	.	.	X	X	X	X	4	20186	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0
ASV22	<i>Pseudomonas marginalis</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1	19728	1
ASV23	<i>Serratia marcescens</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	.	.	.	X	.	.	.	1	19199	1
ASV24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	7779	0	.	.	.	X	.	.	.	.	.	1	6897	0



ASV (gyrB)	Species	B01	B02	B07	B22	B28	B35	B42	Prevalence bean (n=7)	Abundance bean	Isolate bean	R01	R04	R11	R25	R32	R39	R46	R53	R67	Prevalence radish (n=9)	Abundance radish	Isolate radish
ASV25	<i>Pantoea agglomerans</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	X	.	.	.	.	.	X	4	13850	0
ASV27	<i>Pantoea agglomerans</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	X	X	.	.	.	.	.	.	2	11706	3
ASV28	<i>Pseudomonas putida</i>	.	.	.	X	X	X	X	4	10603	24	.	.	.	.	.	.	.	.	X	1	1008	1
ASV30	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	3659	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0
ASV31	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	.	.	.	.	.	.	.	2	7551	1
ASV33	<i>Pseudomonas putida</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	.	.	.	.	.	.	X	1	5907	3
ASV35	<i>Paenibacillus</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	.	.	.	.	.	.	1	5689	1
ASV37	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	.	.	.	X	X	X	X	4	1146	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	1
ASV40	<i>Pseudomonas</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	392	0	X	X	.	X	.	.	.	.	X	4	4252	0



ASV (gyrB)	Species	B01	B02	B07	B22	B28	B35	B42	Prevalence bean (n=7)	Abundance bean	Isolate bean	R01	R04	R11	R25	R32	R39	R46	R53	R67	Prevalence radish (n=9)	Abundance radish	Isolate radish
ASV42	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	.	.	.	.	.	.	1	4436	0
ASV46	<i>Paenibacillus</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	.	.	.	.	.	.	1	3947	0
ASV48	<i>Sphingomonas</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	1252	3	X	.	X	X	X	.	X	.	.	5	2651	0
ASV49	<i>Paucimonas</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	X	.	.	.	.	.	.	3	3783	0
ASV52	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	X	.	.	.	.	.	.	.	2	3316	0
ASV55	<i>Pseudomonas poae</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	.	.	.	.	.	.	1	3041	1
ASV57	<i>Pseudomonas graminis</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	.	.	.	.	.	.	1	3026	0
ASV59	<i>Erwinia</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1	2636	0
ASV62	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	3	.	.	.	.	.	.	.	X	.	1	764	1
ASV66	<i>Sphingomonas</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	1816	3	.	.	.	.	.	.	X	.	.	1	362	0



ASV (gyrB)	Species	B01	B02	B07	B22	B28	B35	B42	Prevalence bean (n=7)	Abundance bean	Isolate bean	R01	R04	R11	R25	R32	R39	R46	R53	R67	Prevalence radish (n=9)	Abundance radish	Isolate radish
ASV73	<i>Plantibacter</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	.	X	.	.	.	.	X	X	4	1628	8
ASV77	<i>Pseudomonas syringae</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	.	.	.	.	.	.	1	1701	0
ASV87	<i>Microbacterium</i>	X	X	X	.	.	.	.	3	685	14	.	.	.	.	.	.	X	X	.	2	633	6
ASV90	Firmicutes	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	X	X	.	.	.	.	.	.	2	1260	0
ASV97	<i>Sphingomonas</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1147	0
ASV100	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1	1061	0
ASV104	<i>Rickettsia</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	X	.	.	.	.	.	2	1016	0
ASV155	<i>Enterobacteraceae</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	.	.	X	.	.	.	.	.	.	1	511	0
ASV196	<i>Sphingomonas phyllosphaerae</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	NA	0	X	.	.	.	.	.	.	.	.	1	274	0

ASVs detected consistently across all replicates ( $n=3$ ) of at least one single seed stage. Isolation of representative bacterial strains is indicated in the column “Isolates”.



**Table S2: Core ASVs detected per stage with 16S rRNA gene.**

ASV (16S)	Genus	B01	B02	B07	B22	B28	B35	B42	Prevalence bean (n=7)	R01	R04	R11	R25	R32	R39	R46	R53	R67	Prevalence radish (n=9)
ASV2	<i>Pantoea</i>	X	.	.	.	.	.	.	1	X	X	X	.	X	.	.	X	X	6
ASV3	<i>Pseudomonas</i>	X	.	X	X	.	.	.	3	.	.	.	X	X	X	X	.	.	4
ASV5	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	X	X	X	X	4	X	X	X	.	.	.	.	.	.	3
ASV6	<i>Klebsiella</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	X	X	X	.	.	.	.	.	.	3
ASV7	<i>Pseudomonas</i>	.	.	X	.	X	X	X	5	.	.	.	X	.	.	.	.	.	1
ASV8	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV9	<i>Rosenbergiella</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV10	<i>Pseudomonas</i>	.	.	X	.	.	.	X	2	.	X	.	X	.	.	.	.	.	2
ASV11	<i>Gammaproteobacteria</i>	.	.	X	X	X	X	X	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV13	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	X	X	X	.	.	.	.	.	.	3
ASV14	<i>Enterobacteraceae</i>	.	.	.	.	.	.	.	0	.	X	.	.	.	.	.	.	.	1



ASV15	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV17	<i>Enterobacteraceae</i>	.	.	.	.	.	.	0	.	.	.	.	X	.	.	.	1
ASV19	<i>Duganella</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	X	.	.	.	.	.	.	2
ASV21	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	X	X	X	3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV22	<i>Paenibacillus</i>	.	.	.	.	.	.	0	.	X	X	.	.	.	.	.	2
ASV24	<i>Brevibacterium</i>	.	.	.	X	X	X	3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV29	<i>Neorhizobium</i>	.	X	.	.	.	.	1	.	X	.	.	.	.	.	.	1
ASV34	<i>Sphingomonas</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	X	.	X	.	.	.	.	3
ASV35	<i>Sphingomonas</i>	X	X	.	.	.	.	2	X	X	.	.	.	.	.	.	2
ASV36	<i>Sphingomonas</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV41	<i>Pseudomonas</i>	.	.	X	.	X	X	3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV43	<i>Massilia</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV49	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	X	X	X	3	.	.	.	.	.	.	.	.	0



ASV50	<i>Sphingomonas</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV55	<i>Lactococcus</i>	.	.	.	.	.	.	0	.	X	X	.	.	.	.	.	2
ASV59	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	X	X	2	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV61	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	X	X	X	3	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV63	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	.	X	1	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV64	<i>Janthinobacterium</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV65	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	X	X	2	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV67	<i>Methylobacterium</i>	X	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV76	<i>Aurantimonas</i>	.	.	.	.	.	.	0	X	.	.	.	.	.	.	.	1
ASV86	<i>Enterobacteraceae</i>	.	.	.	.	.	.	0	.	X	.	.	.	.	.	.	1
ASV92	<i>Pseudomonas</i>	.	.	.	.	.	X	1	.	.	.	.	.	.	.	.	0
ASV95	<i>Microbacteriaceae</i>	.	.	.	.	.	X	1	.	.	.	.	.	.	.	.	0

ASVs detected consistently across all replicates ( $n=3$ ) of at least one single seed stage. Isolation of representative bacterial strains is indicated in the column "Isolates".



**Table S3: Characteristics of sequenced genomes.**

Name	Host	Habitat	Closest NCBI genome	Taxonomy	ASV	Contig	Size (bp)	CDS	OG	Cluster_bean	Cluster_radish
CFBP13617	Phaseolus vulgaris Flavert	bud	Microbacterium sp. BH-3-3-3	Microbacterium	ASV87	9	3559858	3276	2924	Bean_cluster4	Radish_cluster1
CFBP8775	Phaseolus vulgaris Flavert	bud	Plantibacter cousiniae VKM Ac-1787	Plantibacter	ASV73	14	4397458	4065	3631	Bean_cluster4	Radish_cluster4
CFBP8776	Phaseolus vulgaris Flavert	bud	Pseudomonas sp. LG1E9	P. fluorescens subgroup	ASV2	65	6046465	5456	5074	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP13601	Phaseolus vulgaris Flavert	bud	Pseudomas sp. Leaf127	P. syringae group	ASV5	52	6148814	5486	5020	Bean_cluster4	Radish_cluster1
CFBP13702	Phaseolus vulgaris Flavert	bud	Pseudomonas fluorescens PfR 37	P. fluorescens subgroup	ASV4	143	6037302	5300	4885	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8777	Phaseolus vulgaris Flavert	flower	Pseudomas sp. Leaf127	P. syringae group	ASV5	59	6139145	5480	5019	Bean_cluster4	Radish_cluster1
CFBP13700	Phaseolus vulgaris Flavert	flower	Pseudomonas fluorescens PfR 37	P. fluorescens subgroup	ASV4	174	6002826	5293	4882	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8778	Phaseolus vulgaris Flavert	fruit	Pseudomonas fluorescens PfR 37	P. fluorescens subgroup	ASV4	70	6013069	5286	4887	Bean_cluster4	Radish_cluster3



Name	Host	Habitat	Closest NCBI genome	Taxonomy	ASV	Contig	Size (bp)	CDS	OG	Cluster_bean	Cluster_radish
CFBP13611	Phaseolus vulgaris Flavert	fruit	Pseudomonas sp. LG1E9	P. fluorescens subgroup	ASV2	58	6046369	5447	5071	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8778	Phaseolus vulgaris Flavert	fruit	Pseudomas sp. Leaf127	P. syringae group	ASV5	57	6140205	5473	5019	Bean_cluster4	Radish_cluster1
CFBP13599	Phaseolus vulgaris Flavert	seed (B22)	Pseudomas coleopterorum LMG 28558T	P. fragi subgroup	ASV28	47	4855993	4289	4074	Bean_cluster2	Radish_cluster4
CFBP13603	Phaseolus vulgaris Flavert	seed (B22)	Sphingomonas sp. PP-CE-3G-477	Sphingomonas	ASV66	86	4420418	3941	3466	Bean_cluster4	Radish_cluster1
CFBP8781	Phaseolus vulgaris Flavert	seed (B28)	Pseudomonas orientalis DSM 17489T	P. fluorescens subgroup	ASV1	54	5802148	5118	4747	Bean_cluster2	Radish_cluster1
CFBP13703	Phaseolus vulgaris Flavert	seed (B35)	Pseudomonas orientalis DSM 17489T	P. fluorescens subgroup	ASV1	228	5847243	5114	4743	Bean_cluster2	Radish_cluster1
CFBP13615	Phaseolus vulgaris Flavert	seed (B42)	Pseudomas coleopterorum LMG 28558T	P. fragi subgroup	ASV28	25	4842123	4284	4069	Bean_cluster2	Radish_cluster4
CFBP13701	Phaseolus vulgaris Flavert	seed (B42)	Pseudomonas orientalis DSM 17489T	P. fluorescens subgroup	ASV1	191	5827199	5121	4741	Bean_cluster2	Radish_cluster1
CFBP8783	Raphanus sativus Flamboyant5	bud	Pantoea agglomerans GB-1	P. agglomerans	ASV3	90	5124033	4840	4542	Bean_cluster4	Radish_cluster3



Name	Host	Habitat	Closest NCBI genome	Taxonomy	ASV	Contig	Size (bp)	CDS	OG	Cluster_bean	Cluster_radish
CFBP8784	Raphanus sativus Flamboyant5	bud	Pantoea agglomerans UBA1585	P. agglomerans	ASV6	32	4755237	4337	4233	Bean_cluster3	Radish_cluster3
CFBP8803	Raphanus sativus Flamboyant5	bud	Erwinia persicina NBRC 102418T	Erwinia	ASV8	73	4897238	4493	4334	Bean_cluster1	Radish_cluster3
CFBP13649	Raphanus sativus Flamboyant5	flower	Pseudomonas sp. LG1E9	P. fluorescens subgroup	ASV2	61	6315364	5723	5330	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8785	Raphanus sativus Flamboyant5	flower	Pantoea agglomerans NBRC 102470	P. agglomerans	ASV3	101	4962916	4648	4408	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8786	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R25)	Pantoea agglomerans NCTC10601	P. agglomerans	ASV3	51	4928760	4576	4366	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8787	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R25)	Pseudomonas fluorescens PfR 37	P. fluorescens subgroup	ASV4	65	6016319	5291	4888	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8799	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R25)	Pseudomonas syringae pv. Primulae ICMP3956	P. viridiflava	ASV9	82	6035893	5388	4957	Bean_cluster3	Radish_cluster3
CFBP8788	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R25)	Pseudomonas sp. LG1E9	P. fluorescens subgroup	ASV2	63	6045815	5455	5074	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8789	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R32)	Pseudomonas sp. LG1E9	P. fluorescens subgroup	ASV2	63	6046475	5456	5072	Bean_cluster4	Radish_cluster3



Name	Host	Habitat	Closest NCBI genome	Taxonomy	ASV	Contig	Size (bp)	CDS	OG	Cluster_bean	Cluster_radish
CFBP8790	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R39)	Microbacterium sp. Leaf436	Microbacterium	ASV87	14	3445937	3160	2843	Bean_cluster4	Radish_cluster1
CFBP8791	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R39)	Pantoea agglomerans NCTC10601	P. agglomerans	ASV3	71	4905192	4553	4372	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8802	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R39)	Pseudomonas syringae pv. Primulae ICMP3956	P. viridiflava	ASV9	45	5947296	5265	4885	Bean_cluster3	Radish_cluster3
CFBP8800	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R46)	Pantoea agglomerans GB-1	P. agglomerans	ASV3	50	5117730	4806	4554	Bean_cluster4	Radish_cluster3
CFBP8792	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R46)	Pantoea agglomerans NCTC10601	P. agglomerans	ASV6	54	5239108	4959	4605	Bean_cluster3	Radish_cluster3
CFBP8793	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R53)	Pseudomonas orientalis DSM 17489T	P. fluorescens subgroup	ASV1	56	5799590	5114	4747	Bean_cluster2	Radish_cluster1
CFBP8794	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R67)	Microbacterium sp. Leaf436	Microbacterium	ASV87	22	3501981	3227	2878	Bean_cluster4	Radish_cluster1
CFBP8795	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R67)	Erwinia persicina NBRC 102418T	E. persicina	ASV7	77	5148964	4786	4594	Bean_cluster1	Radish_cluster3
CFBP8796	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R67)	Pseudomonas orientalis DSM 17489T	P. fluorescens subgroup	ASV1	67	5802756	5100	4745	Bean_cluster2	Radish_cluster1



Name	Host	Habitat	Closest NCBI genome	Taxonomy	ASV	Contig	Size (bp)	CDS	OG	Cluster_bean	Cluster_radish
CFBP8797	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R67)	Erwinia persicina NBRC 102418T	Erwinia	ASV8	60	4806053	4362	4260	Bean_cluster1	Radish_cluster3
CFBP8798	Raphanus sativus Flamboyant5	seed (R67)	Plantibacter cousiniae VKM Ac-1787	Plantibacter	ASV73	10	4301372	3944	3570	Bean_cluster4	Radish_cluster4

39 isolates representing the most abundant ASVs selected for whole genome sequencing.



**Table S4: Identification of OGs specifically associated to ASV1.**

<b>Group</b>	<b>Locus tag</b>	<b>Functional class</b>	<b>Annotation</b>
0YVP2@NOG	B207_00112	S	Protein of unknown function
0ZHXP@NOG	B207_00612	S	DUF3396 domain-containing protein
0XRPZ@NOG	B207_00736	G	Major facilitator superfamily (MFS) transporter
0XNUY@NOG	B207_00738	S	Protein of unknown function
0Y6B4@NOG	B207_00741	S	Protein of unknown function
11IYK@NOG	B207_00769	G	Polysaccharide Lyase Family 6 protein
0ZZ8S@NOG	B207_00778	S	Protein of unknown function
0ZXQD@NOG	B207_00784	S	DUF2971 domain-containing protein
11G8X@NOG	B207_00809	S	DUF2971 domain-containing protein
10WY9@NOG	B207_00810	S	Protein of unknown function
0XU9R@NOG	B207_00831	S	Chalcone isomerase-like protein
11FP6@NOG	B207_00948	S	Protein of unknown function
0ZXCB@NOG	B207_00954	S	FRG domain-containing protein



<b>Group</b>	<b>Locus tag</b>	<b>Functional class</b>	<b>Annotation</b>
120IJ@NOG	B207_00968	K	Lrp/AsnC ligand binding domain-containing protein
11XV6@NOG	B207_00986	L	DNA breaking-rejoining enzymes, C-terminal catalytic domain-containing protein
0YHFD@NOG	B207_00987	S	Protein of unknown function
0Y8BC@NOG	B207_00998	S	Protein of unknown function
11SNW@NOG	B207_00999	S	YaaC-like protein family
COG3041@NOG	B207_01192	S	Type II toxin-antitoxin system, YafQ family toxin
0Y6KF@NOG	B207_01470	U	Lysophospholipid acyltransferase
0ZM17@NOG	B207_01600	S	NRPS epimerization domain-containing protein
0XNPJ@NOG	B207_01601	Q	Polyketide synthase
0Y021@NOG	B207_01607	S	Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase
COG4332@NOG	B207_01611	S	DUF1062 domain-containing protein
0YSD3@NOG	B207_01805	S	P-aminobenzoate N-oxygenase
0Z0D7@NOG	B207_01889	S	Protein of unknown function
101E9@NOG	B207_02121	S	DUF4276 domain-containing protein



<b>Group</b>	<b>Locus tag</b>	<b>Functional class</b>	<b>Annotation</b>
0XSVW@NOG	B207_02124	L	RT_G2_intron domain-containing protein
1260J@NOG	B207_02127	S	ApeA N-terminal domain-containing protein
COG1100@NOG	B207_02128	S	P-loop_NTPase and COR domain-containing protein
0Z6QW@NOG	B207_02129	S	Protein of unknown function
0Z7M7@NOG	B207_02170	S	RtxA-like domain-containing protein
11Q5V@NOG	B207_02317	K	AraC family transcriptional regulator
11Q45@NOG	B207_02322	S	DUF4437 domain-containing protein
0Y770@NOG	B207_02396	G	Major facilitator superfamily (MFS) transporter
0ZTTB@NOG	B207_02397	S	Cupin-like domain-containing protein
0YN5P@NOG	B207_02455	S	Type II methyl-directed restriction enzyme
0ZW5Q@NOG	B207_02458	S	CheY-like receiver domain-containing protein
COG1943@NOG	B207_02494	L	Transposase IS200 like protein
0Y05B@NOG	B207_02499	S	Protein of unknown function
0Y516@NOG	B207_02501	S	Protein of unknown function



Group	Locus tag	Functional class	Annotation
11P2T@NOG	B207_02504	S	DUF2846 domain-containing protein
0ZW29@NOG	B207_02514	V	Type I restriction enzyme R protein N-terminus domain-containing protein
128PC@NOG	B207_02515	S	Protein of unknown function
11S6W@NOG	B207_02516	S	Protein of unknown function
11S9K@NOG	B207_02621	L	BRCT_DNA_ligase_like domain-containing protein
0ZWIB@NOG	B207_02799	T	TMAO reductase sytem sensor
0YJD5@NOG	B207_02823	S	Phenazine biosynthesis protein PhzB
0ZIU4@NOG	B207_02838	S	Peptidase_M48_M56 super family
1289M@NOG	B207_02861	S	DUF3396 domain-containing protein
11W0T@NOG	B207_02899	S	DnaQ-like 3'-5' exonuclease domain-containing protein
123HH@NOG	B207_02911	S	Protein of unknown function
0ZHCY@NOG	B207_02926	S	Protein of unknown function
11PMA@NOG	B207_02931	S	Restriction endonuclease
11K96@NOG	B207_02933	S	Protein of unknown function



Group	Locus tag	Functional class	Annotation
COG3258@NOG	B207_03003	C	Thiosulfate dehydrogenase
0XZ1Y@NOG	B207_03287	K	LysR-family transcriptional regulator
0XQ8D@NOG	B207_03396	S	DMT family transporter
121ZC@NOG	B207_04121	K	Helix-turn-helix XRE-family like protein
0Z5SQ@NOG	B207_04316	S	Protein of unknown function
11V7Q@NOG	B207_04323	S	Protein of unknown function
11I4E@NOG	B207_04448	S	Protein of unknown function
0XPMU@NOG	B207_04451	S	Nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
10NS1@NOG	B207_04452	S	AbiEi_3_N and AbiEi_3 domain-containing protein
0Z391@NOG	B207_05107	S	Protein of unknown function
11MWI@NOG	B207_05109	S	Protein of unknown function
1243Y@NOG	B207_05111	S	Protein of unknown function
11X8W@NOG	B207_05170	L	Transposase

Orthologous groups (OGs) associated to *P. orientalis* (ASV1) were classified into broad functional categories: Energy production and conversion (C), Carbohydrate transport and metabolism (G), Transcription (K), Replication, recombination and repair (L), Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism (Q) and Unknown function (S).



### III. Conclusion

Cette première étude portant sur la dynamique d'assemblage du microbiote des graines au cours du développement de la graine a mis en évidence des différences marquées entre les deux espèces végétales ciblées :

- Chez le haricot, les premiers taxons colonisant la graine sont conservés tout au long du développement de la graine. Ces taxons affiliés à l'espèce *Pseudomonas orientalis*, ne sont pas détectés dans les boutons floraux et les fleurs de haricot et sont donc probablement transmis par une voie indépendante de la voie florale. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la voie systémique est la principale voie de colonisation de la graine par *P. orientalis*. De plus, en fin de maturation de la graine de haricot, une augmentation de la diversité phylogénétique est observée ce qui traduit probablement une acquisition de micro-organismes par la voie externe *via* le fruit.
- En ce qui concerne le radis, une hétérogénéité plus importante dans la structure taxonomique des communautés microbiennes est observée à chaque stade de développement mais également au sein de chaque échantillon. De plus, un remplacement phylogénétique important des taxons microbiens au cours du développement de la graine a été démontré. En raison de la variabilité importante dans la composition des communautés bactériennes des graines de radis, il est toutefois difficile de savoir si ce remplacement phylogénétique est une conséquence des phases de développement de la graine. En effet, cette grande variabilité des structures microbiennes observée chez le radis peut être expliquée par l'apport de taxons par la voie florale. La voie florale présentant chez le radis une voie de transmission importante de micro-organismes aux graines, elle permet d'augmenter significativement le pool de taxons transmissible aux graines.

La différence de structure des ensembles bactériens associés aux pièces florales et aux graines de haricot ainsi que la proximité phylogénétique de ces membres a permis d'initier une étude de génomique comparée entre souches représentatives de ces populations. Cette étude met en évidence un certain nombre de gènes candidats associés au système de sécrétion de type III et à la production de métabolites secondaires. Ces déterminants pourraient donc être impliqués dans la transmission efficace des souches de *P. orientalis*.



Les résultats de ce chapitre présentent un premier aperçu des processus qui régissent l'assemblage du microbiote des graines. La forte variabilité dans la composition microbienne observée entre les lots de graines de radis, nous a conduit à nous interroger sur l'assemblage du microbiote des graines à l'échelle de la graine individuelle. Cette seconde étude, présentée dans le chapitre suivant, est basée sur un échantillonnage plus important. De plus, chaque échantillon est une graine unique, soit un individu et non plus un lot de graines. Par ailleurs, afin de mieux cerner les sources d'inoculum du microbiote des graines, un échantillonnage du compartiment aérien ainsi que du système vasculaire des tiges a été réalisé en plus du compartiment floral.



# CHAPITRE 2

*Assemblage du microbiote de la graine individuelle  
de la plante mère à la plantule*



## I. Introduction

### a. Contexte

Dans le précédent chapitre, nous avons analysé la dynamique du microbiote des graines pendant leur développement. Cependant, comme dans la plupart des articles s'intéressant au microbiote des semences, les graines ont été étudiées à partir de lots de 100 à 1 000 graines. L'utilisation de lots de graines plutôt que de graines individuelles est en partie liée aux difficultés techniques que présente la collecte d'une quantité suffisante d'ADN microbien à partir d'une seule graine (Mundt and Hinkle 1976). Cependant, caractériser des lots de semences ne permet ni d'estimer la diversité microbienne associée à une graine, ni d'estimer la variabilité de la structure taxonomique entre les graines. Les quelques études réalisées au niveau de graines individuelles ont révélé une faible richesse microbienne associée à cet habitat. Il a même été proposé que chaque graine était colonisée par un seul micro-organisme voire aucun (Newcombe 2018). Les auteurs de cette étude proposent « l'hypothèse du symbiote primaire » selon laquelle la transmission microbienne est limitée à une seule population microbienne. Ce goulot d'étranglement serait dû à l'action conjointe des réactions de défense des plantes ainsi que des interactions compétitives entre les micro-organismes. La deuxième partie de l'hypothèse du symbiote primaire souhaite démontrer l'importance des symbiotes des graines dans la germination et le développement des jeunes plantules (Johnston-Monje *et al.* 2016). En effet, il est proposé que le symbiote primaire puisse agir sur le phénotype de la plantule en diminuant la sévérité d'une maladie (Busby 2016; Ridout and Newcombe 2016). Cependant, à ce jour peu d'études se sont intéressées à la transmission de ces symbiotes primaires de la graine à la plantule et à leur impact sur le phénotype de la plantule (Aschehoug *et al.* 2012, 2014). De plus, les études actuelles portant sur la transmission de la graine à la plantule ont porté sur l'analyse de plusieurs sous-échantillons d'un même lot et non à l'échelle d'un même individu (Barret *et al.* 2015; Yang *et al.* 2017; Bergna *et al.* 2018; Rochefort *et al.* 2020). Enfin, dans le précédent chapitre nous nous sommes intéressés aux sources d'inoculum du microbiote des semences en analysant les communautés microbiennes associées aux parties florales. Dans ce chapitre, nous avons, en plus des parties florales, échantillonné et analysé le microbiote du système vasculaire et de la fraction aérienne afin d'affiner nos connaissances sur la provenance des taxons microbiens associés aux graines.



### b. Objectifs et stratégies

Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour objectifs principaux de **caractériser la diversité bactérienne de graines individuelles pendant leur développement**. Nous souhaitons dans ce chapitre répondre à différentes questions :

Est-ce que les premiers micro-organismes qui colonisent la graine pendant son développement s'établissent sur graines matures ? Quelles sont les principales voies de transmission de ces micro-organismes ? Quels sont les processus écologiques impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines ?

Dans une seconde partie de l'étude, nous avons **évalué la transmission des micro-organismes aux plantules et leur impact sur le phénotype de leur hôte**. En effet, la présence d'un micro-organisme, sur ou dans les graines, ne garantit pas nécessairement sa transmission à la plantule (Baker and Smith 1966). Afin d'évaluer la transmission des taxons bactériens de la graine à la plantule, nous avons travaillé au niveau de graines et plantules individuelles en utilisant un échantillonnage non destructif. Nous nous sommes spécifiquement focalisés sur les deux questions suivantes :

Est-ce que l'abondance initiale des taxons transmis par les graines est un bon prédicteur de leur transmission aux plantules ? Quel est l'impact de ces taxons dans les phases de germination et de développement des plantules ? Ces expériences de suivi de la germination et de la levée ont été réalisées en conditions axéniques afin de limiter les sources d'inoculum extérieur (aérien ou tellurique).

Ce travail a été réalisé sur les deux espèces végétales étudiées lors du chapitre précédent, le haricot et le radis. Nous nous sommes limités à la fraction bactérienne du microbiote des graines. Cette limitation est purement technique. En effet, le travail à l'échelle d'une graine individuelle implique la nécessité d'amplifier en milieu de culture le microbiote des graines afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour le séquençage (Mundt and Hinkle 1976). Dans ce chapitre, nous avons utilisé une approche métabarcoding (marqueurs bactériens : ARNr 16S V4 et *gyrB*) afin d'évaluer la composition du microbiote des graines et des plantules individuelles. La même approche a été utilisée pour analyser le microbiote des fleurs, du système vasculaire et de l'environnement aérien, dans le but d'estimer les sources d'inoculum des graines. Enfin, nous avons réalisé des inoculations de taxons microbiens sur graines afin d'évaluer leur impact sur le phénotype des plantules.



### c. Contribution des auteurs à ce travail

Au cours de ces travaux, j'ai conçu les plans expérimentaux avec Matthieu BARRET, réalisé les échantillonnages ainsi que les analyses métabarcoding, les expériences de transmission et les analyses phénotypiques des plantules. J'ai également réalisé la production des figures et la rédaction de l'article. L'échantillonnage a été réalisé avec l'aide de membres de l'équipe EmerSys (Anne PREVEAUX, Coralie MARAIS, Brice MAROLEAU, Marie SIMONIN, Armelle DARRASSE, Chrystelle BRIN et Matthieu BARRET). Les banques d'amplicons ont été réalisées avec l'aide de Coralie MARAIS et Brice MAROLLEAU en association avec Muriel BAHUT du plateau ANAN (SFR QUASAV). Les expériences *in vitro* de croissance des plantules et les analyses phénotypiques ont été réalisées avec l'aide d'Anne PREVEAUX. Marie SIMONIN et Béatrice LAROCHE ont participé à l'analyse des données métabarcoding. Béatrice LAROCHE a réalisé les analyses des modèles neutres présentées dans la section « analysis of species-proportion distributions ». L'ensemble des auteurs a participé à l'édition et à la révision du manuscrit. Ce manuscrit est actuellement en révision dans « New Phytologist ».



## II. Résultats

### Single seed microbiota: assembly and transmission from parent plant to seedling

**Running title :** Single seed microbiota

Guillaume Chesneau<sup>1</sup>, Béatrice Laroche<sup>2</sup>, Anne Préveaux<sup>1</sup>, Coralie Marais<sup>1</sup>, Martial Briand<sup>1</sup>, Brice Marolleau<sup>1</sup>, Marie Simonin<sup>1</sup>, Matthieu Barret<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, 78350 Jouy-en-Josas, France

\*email : [matthieu.barret@inrae.fr](mailto:matthieu.barret@inrae.fr)

**Abstract :** Gaining basic understanding of processes involved in seed microbiota assembly is a prerequisite for improving crop establishment. Investigation of microbiota structure during seed development revealed that individual seeds of bean and radish were associated with a dominant bacterial taxon representing more than 75% of all reads. The identity of this taxon was highly variable between plants and within seeds of the same plant. We identified *Selection* as the main ecological process governing succession of dominant taxa during seed filling and maturation. In a second step, we evaluated seed to seedling transmission of seed-borne taxa in gnotobiotic system to avoid environmental disturbances. We showed that initial bacterial abundance on seeds was not a good predictor of seedling transmission. However, community profiling and *in planta* experiments allowed us to identify one *Pantoea agglomerans* and two Firmicutes impacting detrimentally and beneficially the seedling phenotype. They can be of interest to develop seed-microbial inoculum possessing plant growth-promoting or biocontrol abilities. Altogether this work revealed that seeds are colonized by few bacterial taxa of highly variable identity, which appears to be important for the early stages of plant development.



**Introduction :**

The seed microbiota allows the transmission of microbial communities between plant generations (Shade, Jacques and Barret 2017) and is a key factor influencing both seed vigor and seedling development, two essential steps for crop establishment. Several studies focused on the role of the mature seed microbiota in releasing dormancy (Goggin *et al.* 2015), improving germination (Escobar Rodriguez *et al.* 2019) or protecting against damping-off (Chen *et al.* 2012). In addition, seed microbiota may have longer-term consequences on crop establishment by promoting establishment of soil-borne plant-beneficial microorganisms (Ridout *et al.* 2019) or limiting the incidence of soil-borne plant pathogens (Matsumoto *et al.* 2021). However, all the above-mentioned studies characterized microbiota of dried mature seeds, while limited knowledge is available on the dynamics of microbiota assembly during seed development (Chesneau *et al.* 2020). A consequence of this knowledge gap is that the origin, timing of arrival and succession of seed-associated microbial taxa is mostly unknown, as well as their future consequences on seed vigor and seedling development.

To date, the characterization of seed microbiota structure has been performed on about 50 plant species (Simonin *et al.* 2021) including major crops such as barley (Yang *et al.* 2017), bean (Klaedtke *et al.* 2016), rapeseed (Rocheffort *et al.* 2019), rice (Kim *et al.* 2020: 20), tomato (Bergna *et al.* 2018) and wheat (Yang *et al.* 2017). *Selection* by the local environment or by the host significantly modulates seed microbiota composition (Klaedtke *et al.* 2016; Rocheffort *et al.* 2019; Morales Moreira, Helgason and Germida 2020). Other ecological processes such as dispersal by pollinators (Prado *et al.* 2020) and ecological drift (Rezki *et al.* 2018) are also important drivers of seed community assembly. However, in most studies seed microbiota was characterized on large seed samples from 10 to 1 000 seeds. One reason for using seed lots rather than individual seeds is related to the technical difficulties of collecting enough microbial DNA from a single seed as these are usually colonized by a low bacterial population size (Mundt and Hinkle 1976). Another rationale for using seed samples is related to historical studies carried out in seed phytopathology. Indeed, seed-transmitted plant pathogens are generally distributed within a Poisson distribution (Gitaitis and Walcott 2007) and increasing sampling size increases the probability of detection. While working on seed lots is valid for improving plant pathogen detection, this sampling procedure artificially increases seed microbiota richness and more importantly does not allow the estimation of seed-to-seed variability.



The few studies carried out at the individual seed level or small seed samples (i.e. less than 10 seeds) through culture-dependent (Mundt and Hinkle 1976; Newcombe *et al.* 2018) or – independent (Abdelfattah *et al.* 2021; Bintarti *et al.* 2021; Fort *et al.* 2021) approaches have revealed a low microbial richness. It has even been proposed that each seed was colonized by none or only one endophytic microorganism (Newcombe *et al.* 2018). The authors of the latter study propose a hypothesis, the “primary symbiont hypothesis”, that endophyte microbial transmission in seed is bottlenecked as a result of plant defenses and interactions among seed-transmitted microorganisms (Newcombe *et al.* 2018). However, this hypothesis has still not been confirmed at the whole individual seed microbiota level, which includes endophyte and epiphytes. In addition, the order and routes of arrival of these “primary symbionts” on seeds as well as the ecological processes involved in their assembly remained unexplored.

The interest in studying and characterizing the seed microbiota is to improve the phenotype of the future plant. To this end, it is essential to know the future of seed-associated taxa on the seedlings and the impact they may have on the plant phenotype, whether beneficial or harmful. However, the presence of a microorganism, on, or in seeds is not a guarantee of transmission to the seedling (Baker and Smith 1966). To date studies focusing on the dynamics of microbial communities during germination and emergence have been performed on several subsamples of the same seed lot (e.g : Barret *et al.* 2015; Yang *et al.* 2017; Bergna *et al.* 2018; Torres-Cortés 2018; Rochefort *et al.* 2021). However, in order to truly assess transmission of seed-borne bacterial taxa to the seedling, it is necessary to work at the individual seed-seedling level in a non-destructive way.

In this context, this study aimed to characterize the bacterial diversity of individual seeds during their development. Several fundamental questions were addressed: (i) are the first microorganisms that colonize the seed during its development, the ones that will be established on mature seeds? (ii) what are the main seed transmission pathways employed by these seed-borne taxa? and (iii) what are the ecological processes involved in seed microbiota assembly? In the second part of this study, we evaluated the dynamics of seed-borne taxa during individual seedling emergence. Specifically we focused on the following two questions : (iv) was the initial abundance of seed-borne taxa a good predictor of their transmission to seedlings ? (v) what is their impact on seed germination and seedling phenotype?

To answer these questions we worked on seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and radish (*Raphanus sativus*), two plant species whose seed microbiota has been extensively characterized



(Barret *et al.* 2015; Klaedtke *et al.* 2016; Rezki *et al.* 2018; Chesneau *et al.* 2020). We estimated microbiota composition of single seeds of different individual plants during seed filling and maturation through amplicon sequencing. We also inferred the origins of seed-associated taxa through sampling and sequencing of flowers, vascular tissues and atmosphere microbiota. In a second step, we evaluated seedling transmission of seed-borne bacteria by sampling, in a non-destructive way, individual seed and seedling microbiota. This second step was performed aseptically in order to specifically focus on the inheritance of the seed microbiota, avoiding influence of the environment. Finally, we assessed the impact of seed microbiota on seedling emergence and confirmed the impact of some selected taxa on seedling fitness. The results of this study provide essential information on seed microbiota assembly, which can be used for developing microbial-based solutions to improve seed vigor and protection against pathogens.



## Materials and Methods :

### Experiment 1 - Culture-based enrichment of seed-borne bacteria

Sequencing of samples with low microbial biomass, such as seed, is subject to a low signal to noise ratio as a result of weak amounts of DNA starting material (Caruso *et al.* 2019). As the aim of this work was to estimate the structure of bacterial communities associated with a single seed, an enrichment stage of the bacterial biomass was carried out. In a first step, we evaluate whether culture-based enrichment of seed-borne bacteria could increase the population size without distorting the community structure. For this step the comparison between culture-dependent and independent approaches was performed on seed samples detailed in the paragraphs below.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Flavert) and radish (*Raphanus sativus* var. Flamboyant5) were sown at a density of eight bean plants and five radish plants per square meters at the IRHS experimental station (47°28'45.2''N - 0°36'35.6''W) in separate blocks (5m x 10m). Seeds were aseptically removed from fruits with sterile scalpel and tweezers under a laminar flow hood. A seed sample consisted of all the seeds collected from the same plant individual. This corresponded to a mean of 3.4g and 1.8g of seeds for bean and radish samples, respectively. A total of twelve seed samples per plant species were collected and analyzed. The twenty-four seed samples were soaked in 2 ml of phosphate-buffered saline per gram of tissue (PBS, Sigma-Aldrich) supplemented with Tween® 20 (0.05 % v/v, Sigma-Aldrich) per gram of fresh material. Seed soaking was performed at 4°C under constant agitation (150 rpm) for 2h30 and 16h for radish and bean, respectively. These soaking procedures are recommended by the International Seed Testing Association for the detection of seed-transmitted pathogens (Fargier and Manceau 2007; Kurowski and Remeus 2007). Half of the suspension was stored at -20°C, while the other half was serially diluted and plated on 1/10 strength Tryptic Soy Agar (TSA10 : 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 cycloheximide (50 µg.ml<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Plates were incubated at 18°C during 5 days. Bacterial mats were scrapped and collected by adding 2mL of PBS Tween to the Petri dishes and stored at -20°C. DNA extraction was performed on (i) the frozen suspension and (ii) the collected CFU suspension with the NucleoSpin® 96 Food kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the supplier's recommendations.

A preliminary experiment comparing the bacterial diversity obtained on nine culture media was carried out before selecting the TSA10 medium. Three samples of radish seeds were



used for this experiment using the soaking procedure described in the previous paragraph. Resulting suspensions were diluted and plated on the following nine culture media: bacterial screening medium 523 (BSM); casein peptone soybean flour peptone agar (CASO); nutrient broth agar (NB); Reasoner's 2A (R2A); r3 medium (R3M) (Dione *et al.*, 2016); tryptic soy agar 1/10 strength (TSA10); tryptic soy agar (TSA100); tryptone yeast extract glucose (TYG) and yeast extract mannitol agar (YEM). Bacterial mats were collected and DNA extracted with the NucleoSpin® 96 Food kit.

### **Experiment 2 – Community assembly during seed development at the individual seed level**

A second field trial was performed at the experimental station of the National Federation of Seed Multipliers (FNAMS, 47°28'012.42"N - 0°23'44.30"W, Brain-sur-l'Authion, France). The two plant species, common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Flavert) and radish (*Raphanus sativus* var. Flamboyant5) were grown in separate blocks (5 m × 10 m), at a density of eight bean plants and five radish plants per square meters. Flowers from 5 plants at the blooming stage were collected, all flowers from one plant corresponding to one independent sample. Flowers were soaked in 2 ml of PBS Tween per gram of fresh material, then crushed in a lab blender (Stomacher, Mixwel, Alliance Bio Expertise, Guipry, France) for 2 min. Individual seeds from five to seven plants of bean and radish were collected at different stages of the seed development (**Fig. S1**). The number of seeds harvested per plant was determined by the number of seeds available on the plant at a given stage of development. We were then able to sample a total of 96 and 144 seeds per radish and bean plant, respectively. Individual seeds were soaked in 750µL and 1.5mL of PBS Tween for 2h30 and 16h for radish and bean, respectively. Seed water content was estimated at each sampling stage on a bulk of 15 seeds by weighing this sample before and after drying (96°C for 3 days). Vascular flow of stem of each individual plant was collected as follows: a 2 cm section of stem from the bottom of the plant was cut and outer-surface-disinfected with 70° ethanol, then first layers of epidermis were removed using a sterile scalpel. The resulting piece of stem was incubated horizontally for 2.5 h in 2 mL of PBS Tween under constant agitation (200 rpm) at 4°C. Finally, airborne bacteria were collected at each sampling stage. To achieve this, a passive sampling scheme was performed with TSA10 plates placed at 10-20cm from the flowers. Six TSA10 plates were positioned homogeneously within the plot during 3 hours and then incubated at 18°C during 5 days.



All suspensions were serial-diluted and plated on TSA10. After 5 days of incubation at 18°C, the number of bacterial cells was estimated by counting the number of colony-forming units (CFU). We then determined a limit of quantification of 20 CFUs and an upper limit of quantification of 250 CFUs per plate (Sutton 2011). One bacterial mat per sample were scrapped and collected by adding 2mL of PBS Tween to the Petri dishes and stored at -20°C. DNA extraction was performed on the collected CFU suspension with the NucleoSpin® 96 Food kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the supplier's recommendations.

### **Experiment 3 - Community dynamics during emergence at the individual level**

At the last sampling point of experiment 2 (D50 bean; D65 radish), additional mature seeds were collected at the FNAMS experimental station. Thirty-two seeds per individual plants ( $n=5$ ) were collected, corresponding to 160 seeds samples and 160 seedling samples per plant species. Seeds were collected from eight fruits located at four different leaf heights. Four seeds were aseptically collected per fruit. Individual seeds were soaked in 750µL and 1.5mL of PBS Tween for 2h30 and 16h for radish and bean, respectively. After collecting the resulting suspension, seeds were placed in sterile tubes filled with cotton moistened with 4mL of sterile water. Tubes were incubated in a growth chamber (photoperiod: 16h/8h, temperature 25-22°C) to obtain 4-day-old radish and 6-day-old bean seedlings. Seedlings were placed individually in a plastic bag, crushed and resuspended with 2 ml of sterile water. Suspensions of seeds and seedlings were serial-diluted and plated on TSA10 and DNA was extracted as previously reported in experiment 2. The sterility of our experimental system was assessed by collecting cotton from seedless tubes ( $n=30$ ). No CFU was detected on TSA10 after 5 days of incubation at 18°C.

### **Construction and sequencing of amplicon libraries**

A first PCR amplification was performed with the primer sets 515f/806r (Caporaso *et al.* 2011) and *gyrB*\_aF64/*gyrB*\_aR553 (Barret *et al.* 2015), which target the V4 region of 16S rRNA genes and a portion of *gyrB*, respectively. PCR reactions were performed with a high-fidelity Taq DNA polymerase (AccuPrime™ Taq DNA polymerase Polymerase systemSystem, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) using 5µL of 10X Buffer, 1µL of forward and reverse primers (*gyrB*\_aF64/*gyrB*\_aR553 [100µM]; 515f/806r [10µM]), 0.2µL of Taq and 5 µl of DNA. Cycling conditions for 515f/806r was composed of an initial denaturation step 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 at 68°C for 10 min. The cycling conditions for *gyrB*\_aF64/*gyrB*\_aR553 were identical with the



exception of the annealing temperature (55°C instead of 50°C). Amplicons were purified with magnetic beads (Sera-Mag™, Merck, Kenilworth, New Jersey). A second PCR amplification was performed to incorporate Illumina adapters and barcodes. PCR cycling conditions were as follows: denaturation at 94°C (2 min), 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 with magnetic beads and pooled. Concentration of the pool was monitored with quantitative PCR (KAPA Library Quantification Kit, Roche, Basel, Switzerland). Amplicon libraries were mixed with 5% PhiX and sequenced with four MiSeq reagent kits v2 500 cycles (Illumina, San Diego, California, USA). A blank extraction kit control, a PCR-negative control and PCR-positive control (*Lactococcus piscium*, a fish pathogen that is not plant-associated) were included in each PCR plate.

### Microbial community analysis

All scripts and data sets employed in this work are available on GitHub ([https://github.com/martialbriand/IRHS\\_EmerSys](https://github.com/martialbriand/IRHS_EmerSys)). Briefly, 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). Chimeric sequences were removed with the removeBimeraDenovo function. Taxonomic affiliation of amplicon sequence variants (ASVs) was performed with a naive Bayesian classifier (Wang *et al.* 2007) against the Silva 132 taxonomic training data or an in-house *gyrB* database available upon request.

Diversity analyses were conducted with Phyloseq version 1.32.0 (McMurdie and Holmes 2013). Sequences derived from 16S rRNA genes that were unclassified at the phylum-level (0.002%), affiliated to Chloroplasts (0.11%) and Mitochondria (0.05%) were removed. Since the primer set *gyrB*\_aF64/*gyrB*\_aR553 primers can sometimes co-amplified *parE*, a paralog of *gyrB*, the *gyrB* taxonomic training data also contained *parE* sequences. ASVs affiliated to *parE* or unclassified at the phylum-level were removed. Sequences were aligned with DECIPHER version 2.16.1 (Wright, 2016) and neighbor joining phylogenetic trees were constructed with Phangorn version 2.5.5 (Schliep 2011). Identification of sequence contaminants was assessed with decontam version 1.8.0 (Davis *et al.* 2018).

Alpha diversity metrics (richness and Faith's phylogenetic diversity) were measured after rarefaction at 4 000 reads per sample for all datasets and both markers (**Fig. S2**). Changes in bacterial phylogenetic composition were estimated with weighted UniFrac distance (Lozupone and Knight 2005) on log<sub>10</sub>+1 transformed values. Permutational multivariate analysis



of variance was performed with the `adonis2` function of `vegan` 2.5.6 (Oksanen *et al.* 2017). Rank abundance curves were performed with `BiodiversityR` 2.12.3 (Kindt 2015). Number of ASVs shared between specific contrasts were visualized with `UpSetR` 1.4.0 (Conway, Lex and Gehlenborg 2017). Annotations of phylogenetic trees were performed with `iTol` 6.1 (Letunic and Bork 2016).

The relative importance of niche- or neutral-based processes in community assembly was estimated with abundance-based  $\beta$ -null deviation measures. Pairwise comparison of seed communities aggregated at the individual plant level was performed with  $\beta$ -mean-nearest taxon distance (Fine and Kembel 2011). Deviation from the null distribution was assessed with the  $\beta$ -nearest taxon index ( $\beta$ NTI (Stegen *et al.* 2013)).  $\beta$ NTI values  $< -2$  or  $> 2$  indicates that the observed phylogenetic turnover between a pair of communities is primarily driven by Selection (Stegen *et al.* 2013).

### Analysis of species-proportion distributions

When considering the set of all ASV observed on a plant, only a few of them are detected in each seed. This is probably caused by censoring induced by the measurement process, but it probably also comes from an important spatial heterogeneity. We therefore proposed a dedicated approach to provide a species-proportion analysis in seeds at the plant level for the most abundant species ( $> 0.1\%$  of the total ASV abundance). We used the neutral model of Solé and co-workers (Solé, Alonso and McKane 2002) at the seed level, where all ASVs are assumed to be totally equivalent and driven by immigration (probability  $0 < \mu < 1$ ) and internal random replacement (probability  $0 < C < 1$ ). Abundances in each seed follow a beta-binomial (BB) distribution with parameters  $N_c$  (the local ASV population size in the seed),  $\alpha_c, \beta_c$  where  $S$  is the typical species pool size available for immigration in the vicinity of each seed and  $I$  is the ratio of the *per capita* immigration rate over the *per capita* replacement rate  $I_c = \frac{\mu}{(1-\mu)C} (N_c - 1)$  (Laroche *et al.* 2020). To obtain a distribution of seed-borne proportions at the plant level, we assumed that  $N$  followed a uniform distribution whose range  $[N_{min}, N_{max}]$  was determined as the 0.1-0.9 quantiles of the distribution of total ASV number in seeds at a given date. The other parameters ( $S, R = \frac{\mu}{(1-\mu)C}$ ) were assumed to be plant dependent. We computed from the data the proportions of ASVs in each seed at a given date on a given plant, evaluated the first three empirical moments of the mean at the plant level and performed a generalized moment estimation to obtain an estimated value for  $S, R$  and the expected  $I$ , as well as the value of the error criterion (see supplementary method for more details). All computations were coded in R, Wilcoxon test (resp. pairwise

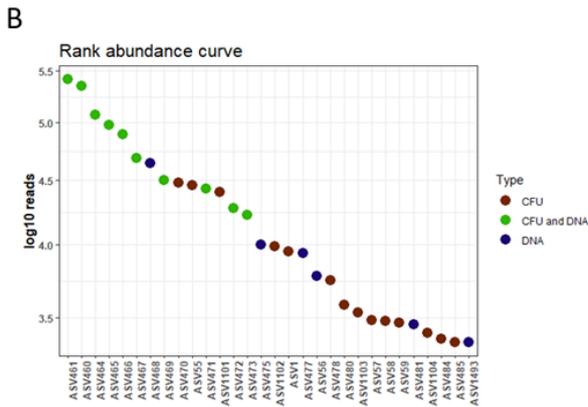
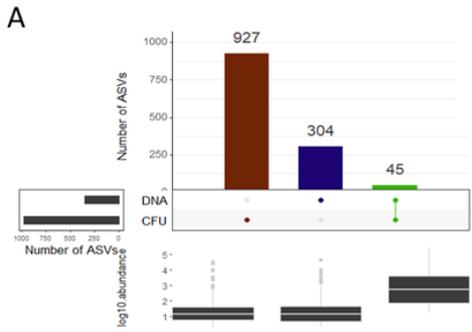


Wilcoxon rank test with Benjamini-Hochberg correction) was used for simple (resp. multiple) comparisons.

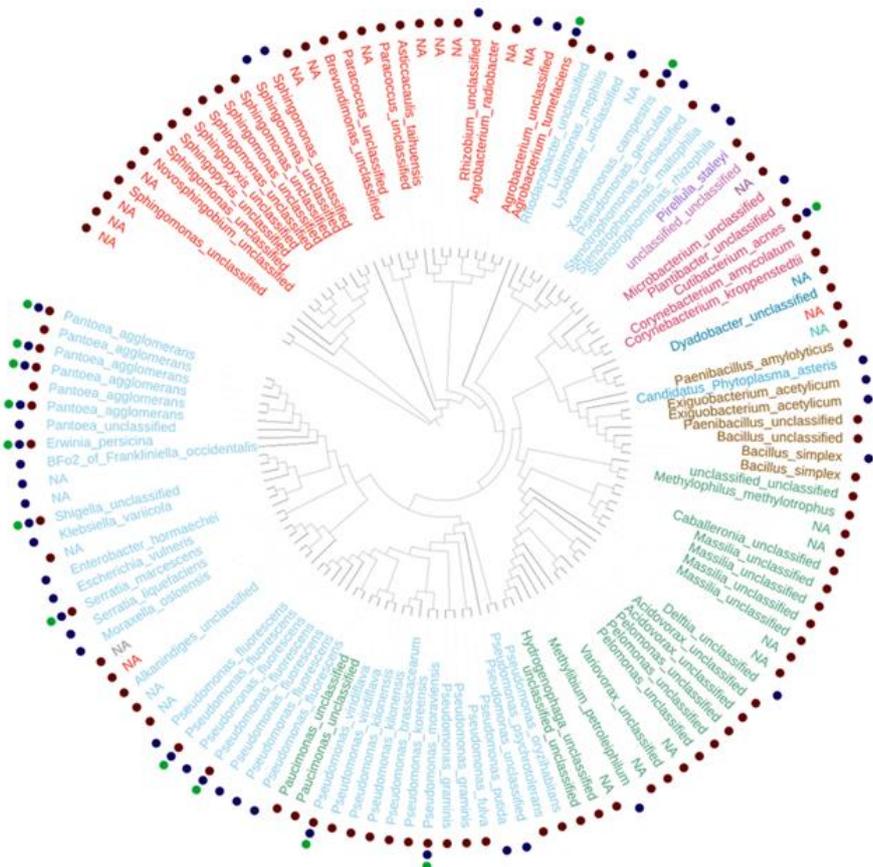
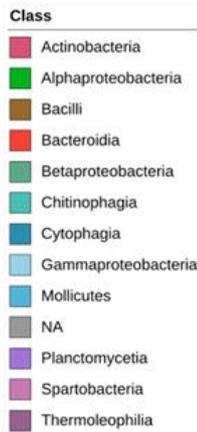
### Seedling phenotype

Seedling phenotype was estimated *via* rules established by the International seed testing association (ISTA, International Rules for Seed Testing 2015) . Briefly, a seedling was considered abnormal if at least 50% of the cotyledons or leaves were necrotic or rotten, if the hypocotyl or epicotyl were deformed, or if the root system was absent, stunted or rotten.

Changes in ASVs relative abundance were assessed with DESeq2 v 1.28 (Love, Huber and Anders 2014). Representative bacterial strains of ASVs significantly enriched in abnormal or normal seedling were selected from an in-house bacterial culture collection derived from bean seeds. Bean seeds (*Phaseolus vulgaris* var. Flavert), were surface-sterilized after 1 min sonication (40 Hertz), soaking for 1 min in 96° ethanol, 5 min in 2.6% sodium hypochlorite, 30 sec in 96° ethanol and rinsed 3 times with sterile water. The seeds were dried on paper and placed in a bacterial inoculum from a fresh 24-hour culture calibrated at DO = 0.01 (approximately 10<sup>7</sup> CFU/mL). The seeds were then dried on paper. In order to check the inoculation of the seeds, half of the dried seeds were individually macerated in a pre-filled plate of PBS Tween. The other half of the seeds were placed in sterile tubes with cotton and moistened with 4mL of water, at the level of one seed per tube. Seedlings phenotypes were evaluated after 6 days in a growth chamber (photoperiod: 16h/8h, temperature 25-22°C). We also analyzed seedling phenotypes of non-disinfected seeds to see the impact of disinfection on seedling phenotype. To confirm the transmission of the inoculated strains, for each phenotype, we gathered seedlings in three plastic bags, one for non-germinated seeds, one for normal seedling and the last one for abnormal phenotypes. Batches were crushed and re suspended with 2 ml of sterile water per individual. Suspensions of seedlings were serial-diluted and plated on TSA 10%. After 5 days, we performed *gyrB* PCR amplification of representative members of each plate with *gyrB\_aF64/gyrB\_aR553* primers. PCR products were sent to GenoScreen for Sanger sequencing.



**C**



**Figure 1: Comparison of seed bacterial community profiles before and after culture-enrichment on TSA10. A.** Visualization of the number of *gyrB* ASVs specifically detected before (DNA) and after (CFU) culture-enrichment, or jointly (CFU and DNA). Log<sub>10</sub> abundance of ASVs are displayed in the boxplots. **B.** Rank abundance curve of the 30 most abundant ASVs. **C.** Neighbor-Joining phylogenetic tree of the most abundant ASVs (minimum relative abundance of 1%). Branch tips colors correspond to the Class taxonomic level. Blue and red circles represented ASVs specifically associated with culture -independent and -dependent approaches, respectively. Green circles represented ASVs detected with both approaches.

**Results :****Experiment 1 – Culture-based enrichment of seed-borne bacterial strains efficiently captured the diversity of the seed microbiota**

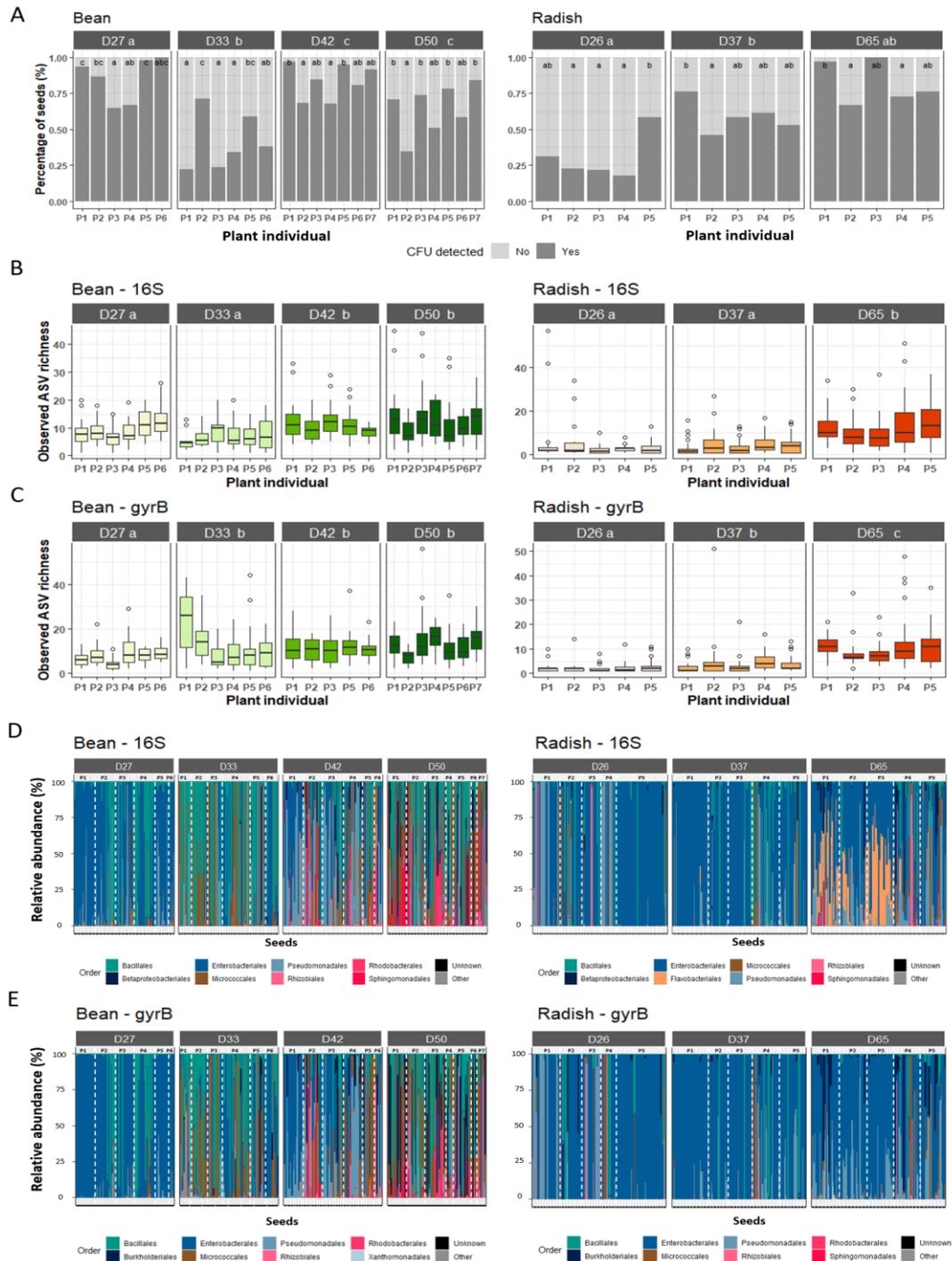
Sequencing of samples with low microbial biomass is subject to a low signal to noise ratio as a result of weak amounts of DNA starting material (Caruso *et al.* 2019). We assessed whether culture-based enrichment of seed-borne bacteria could increase population size without distorting community structure. Firstly, the bacterial diversity obtained after dilution and plating on nine culture media was estimated through amplicon sequencing of two molecular markers that differed in their taxonomic resolution, namely the V4 region of 16S rRNA genes and a portion of *gyrB* (Barret *et al.* 2015). According to Faith's phylogenetic diversity, 1/10 strength Tryptic Soy Agar (hereafter referred to as TSA10) allowed the greatest diversity of bacterial isolates to be obtained (**Fig. S3**), therefore confirming previous results obtained with root-associated bacterial strains (Zhang *et al.* 2021).

In a second step we compared the bacterial community profiles before and after culture-enrichment on TSA10 on 24 bulk seed samples of bean and radish. In total 1 276 ASVs were detected with 45 common to both approaches (**Fig. 1A**) including the most abundant ASVs (**Fig. 1B**). ASVs specifically detected with one of the two approaches were not affiliated to a particular phylogenetic lineage (**Fig. 1C**). Hence, differences in the detection of taxa with or without TSA10 culture-enrichment could be due to differences in amplification of rare taxa. Altogether, these results highlighted that investigating bacterial community assembly is possible with a step of culture-based enrichment and may even allow better detection of rare taxa since 927 ASVs were specifically detected following culture-based enrichment (**Fig. 1A**). For the rest of the study, we systematically performed culture enrichment of our samples before DNA extraction and sequencing.

**Experiment 2 – Assembly and structure of the microbiota during individual seed development**

*Percentage of seeds colonized by cultivable bacteria varied between plants.*

Seeds from bean and radish were collected aseptically during seed filling and maturation, two stages defined by measuring seed water content (**Fig. S1 A**). As expected the percentage of water content significantly decreased during seed development for both plant species, especially during late maturation. Bacteria were detected on average in 43% to 84% of bean seeds per stage



**Figure 2: Structure of the bacterial fraction of the seed microbiota. A.** Percentage of seeds with (dark grey) or without (light grey) CFU detected. **B-C.** Number of ASV per seed (richness) estimated with 16S rRNA genes (**B**) or *gyrB* (**C**). Seeds were grouped according to their plant of origin (x-axis). **D-E.** Relative abundance of bacterial Orders for each individual seed according to 16S rRNA genes (**D**) or *gyrB* (**E**). White dotted lines represented individual plants. The names in each frame correspond to the stages sampled during seed development. The letters (a, b, c) indicated the significance level ( $P < 0.01$ ).

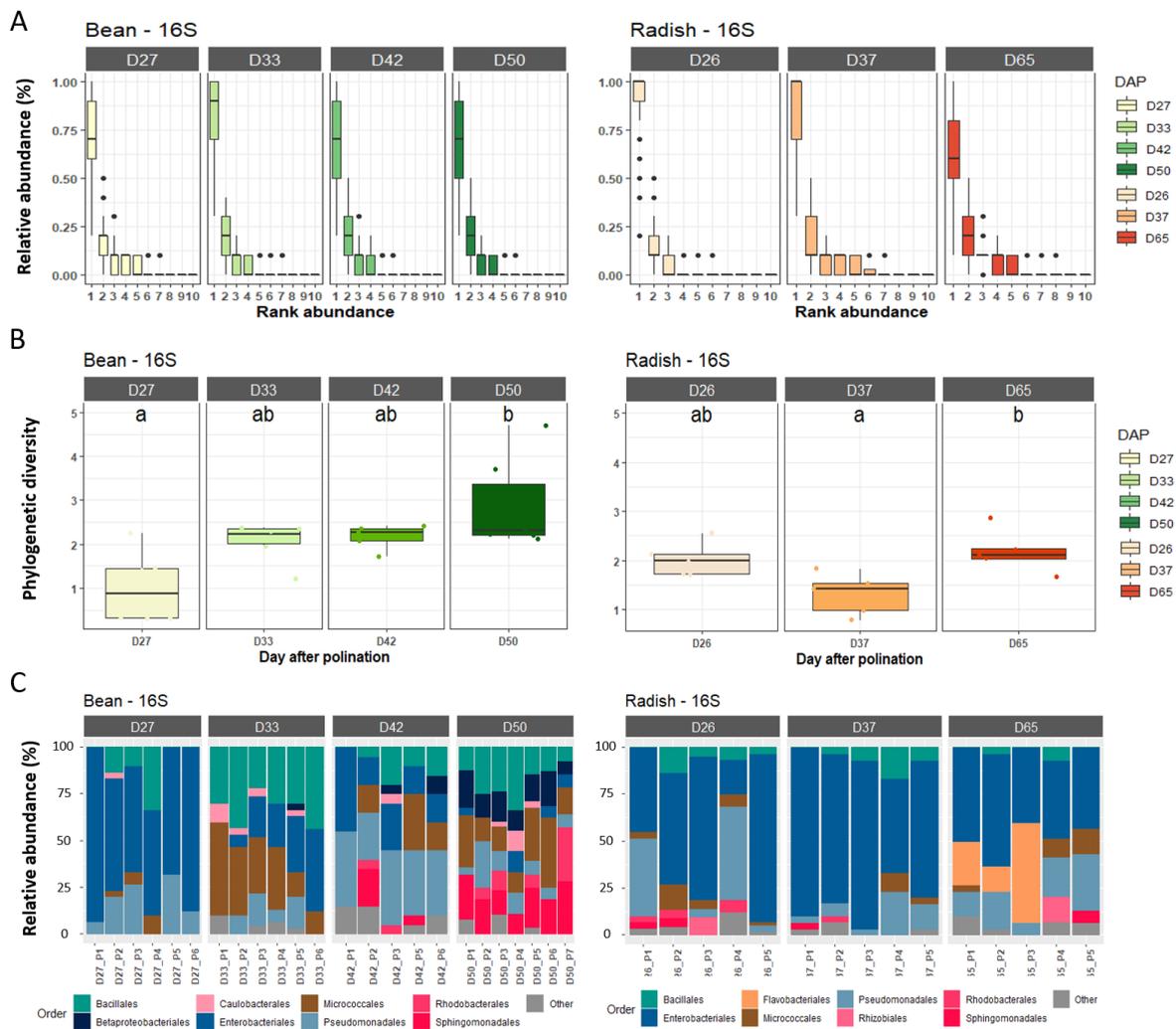
and 30% to 82% of radish seeds per stage (**Fig. 2A**). Variation in the percentage of seeds containing bacteria was associated with the sampling stage for both plant species ( $P<0.01$ ). While no correlation between bean seed development and percentage of seeds containing bacteria was observed, the percentage of seeds containing bacteria gradually increased during radish seed development (**Fig. 2A**). Within each sampling stage, the percentage of seed carrying seed-borne bacteria was significantly ( $P<0.01$ ) different between individual plants and varied from 25% to 100% per bean plant and 20% to 100% for radish (**Fig. 2A**).

#### *Individual seeds are associated with low bacterial richness*

Few bacterial taxa were detected per individual seeds. Indeed, a median richness of eight 16S rRNA genes ASVs in bean and four 16S rRNA genes ASVs in radish were observed (**Fig. 2B**), while a median of nine and three *gyrB* ASVs were observed in bean and radish seeds (**Fig. 2C**). Bacterial richness significantly ( $P<0.01$ ) increased during seed development of both plant species regardless of the molecular markers employed. Moreover, within each sampling stage, high variability in richness between seeds was observed (**Fig. 2B and 2C**). For instance, based on 16S rRNA genes, one to 45 ASVs were detected per bean seed at the mature stage (D50, **Fig. 2B**), while one to 51 ASVs were associated with radish seeds at the same developmental stage (D65, **Fig. 2B**). Variation in richness was accompanied by a high variation in taxonomic composition (**Fig. 2D and 2E**). Changes in phylogenetic composition between seed bacterial communities was significantly ( $P<0.001$ ) explained by the seed development stages for bean (16S rRNA genes: 18.3% ; *gyrB* : 16.1%,) and radish (16S rRNA genes: 15.3% ; *gyrB*: 7.4%). In addition, variation in phylogenetic composition was also significantly ( $P<0.001$ ) associated with plant inter-individual variations in bean (16S rRNA genes: 26.5% ; *gyrB*: 26.1%) and radish (16S rRNA genes: 28.5% ; *gyrB*: 20.0%).

#### *A seed is associated with one dominant bacterial taxa*

One dominant bacterial taxon was associated with bean and radish seeds. According to 16S rRNA genes (**Fig. 3A**), these dominant taxa had mean relative abundance of 77.1% ( $\pm 22.0\%$ ) and 75.4% ( $\pm 22.8\%$ ) with *gyrB* (**Fig. S4A**). The identity of the dominant taxa was highly variable between seeds of both plant species with 94 16S rRNA genes ASVs and 286 *gyrB* ASVs distributed in more than 15 bacterial orders (**Fig. S5 and S6**). For bean, 224 different *gyrB* ASVs were detected as dominant taxa while 80 for radish. Only 18 dominant ASVs were found in common between both plant species. Interestingly for both plant species one *gyrB* ASV affiliated to *Pantoea*



**Figure 3: Dominant bacterial taxa within the seed microbiota based on 16S rRNA genes. A.** Rank abundance curves of bacterial ASVs associated with individual seeds. **B.** Faith's phylogenetic diversity of rank1 ASV agglomerated at the plant level. **C.** Relative abundance of bacterial Orders calculated from rank 1 ASV agglomerated at the plant level. The names in each frame correspond to the stages sampled during seed development. The letters (a, b, c) indicated the significance level ( $P < 0.01$ ).

*agglomerans* (ASV1) was highly prevalent as the dominant taxa with a frequency of 11.5% on bean seeds and 53% on radish seeds (**Table S1 and S2**).

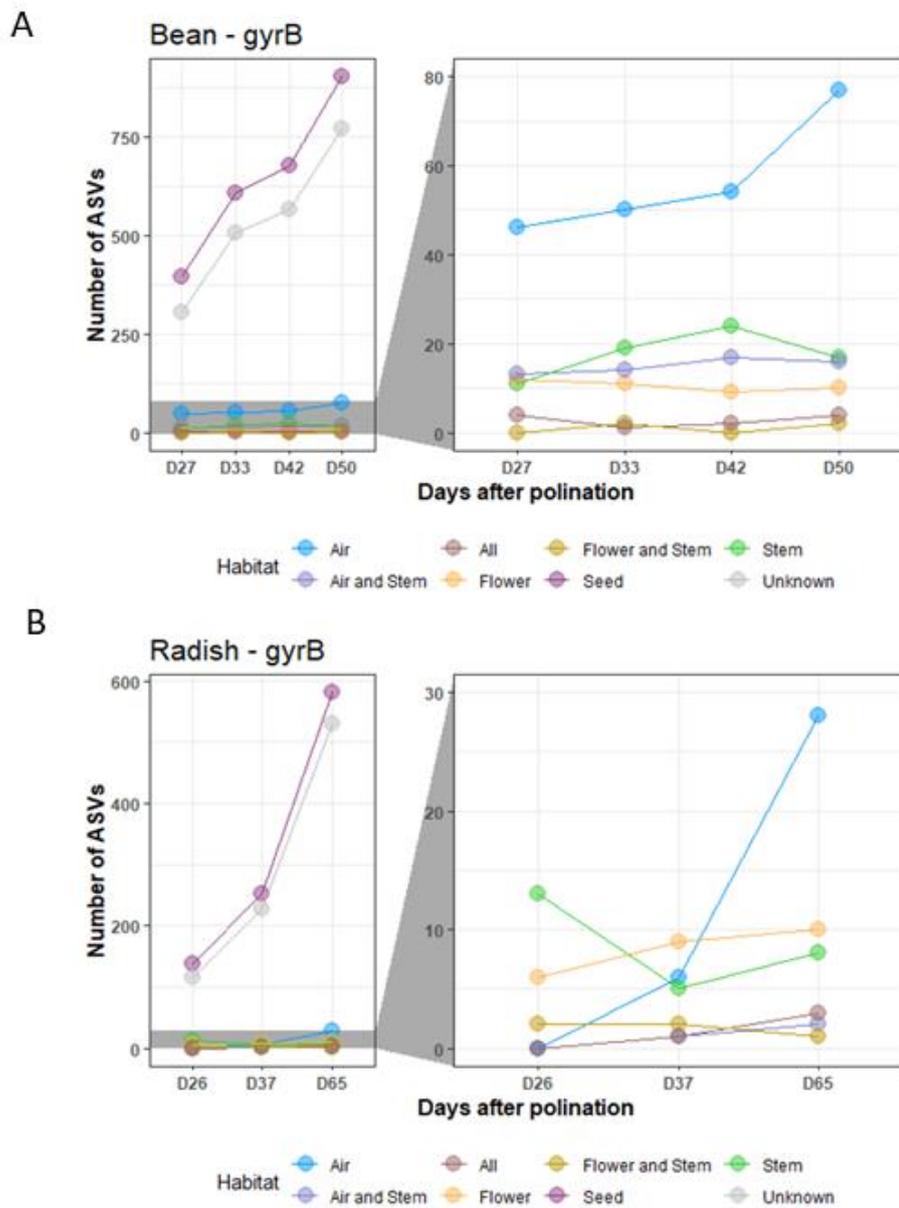
The phylogenetic diversity of dominant taxa per plant significantly ( $P < 0.05$ ) increased during bean seed development (**Fig. 3B**). Moreover, a clear shift in bacterial taxonomic composition was observed during bean seed development with a decrease in the occurrence of dominant taxa affiliated to Enterobacterales (**Fig. 3C and S4C**). Although our destructive sampling does not allow a direct monitoring of microbiota dynamics during seed development, phylogenetic diversity and taxonomic composition indicated succession of dominant taxa over seed filling and maturation of bean. For radish, we did not observe significant change in phylogenetic diversity. However, changes in taxonomic composition of dominant taxa per plant species was observed with an increase in occurrence of Flavobacteriales during the last seed maturation stage (**Fig. 3C**).

Within a sampling stage, a large variation in taxonomic composition was observed between seed bacterial communities from different plants (**Fig. 2D**). The distribution pattern of seed dominant taxa indicated a significant (Chi-squared test,  $P < 0.01$ ) association between some dominant taxa and specific plant individuals (**Fig. S5, S6 and Table S3**). For instance, at D27 in bean, one dominant taxa affiliated to Erwiniaceae with 16S rRNA genes and *gyrB* was significantly more frequent in plant 1 (**Fig. S5, S6 and Table S3**). Hence the identity of dominant seed-associated taxa appeared to be dependent on the local pool of bacterial taxa found within one specific plant individual.

#### *The origin of seed-associated taxa*

To gain more insight on the potential inoculum sources of the seed microbiota, we performed additional sampling of the bacterial fraction of the microbiota after culture enrichment on three distinct habitats, namely flowers, stems and atmosphere (**Fig. S1C**). These three habitats could represent the main sources of the floral, internal and external pathways described for seed transmission (Maude 1996). Detection of *gyrB* sequence variants was employed in this section as *gyrB* has a better taxonomic resolution (i.e. infraspecific) than 16S rRNA genes.

Observed richness associated with atmosphere, flowers and stems was lower than on seeds for most of the seed developmental stages (**Fig. S7A**). All communities were dominated by bacteria belonging to the Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes (**Fig. S7B**). The temporal



**Figure 4: Origin of seed-borne taxa. A-B.** Number of *gyrB* ASVs associated with bean (A) and radish (B) seeds that were detected in other sampled habitats: flowers, stems and atmosphere. Unknown (grey) correspond to seed-associated taxa not detected in any source habitat sampled. The right panel is a zoom of the left panel.

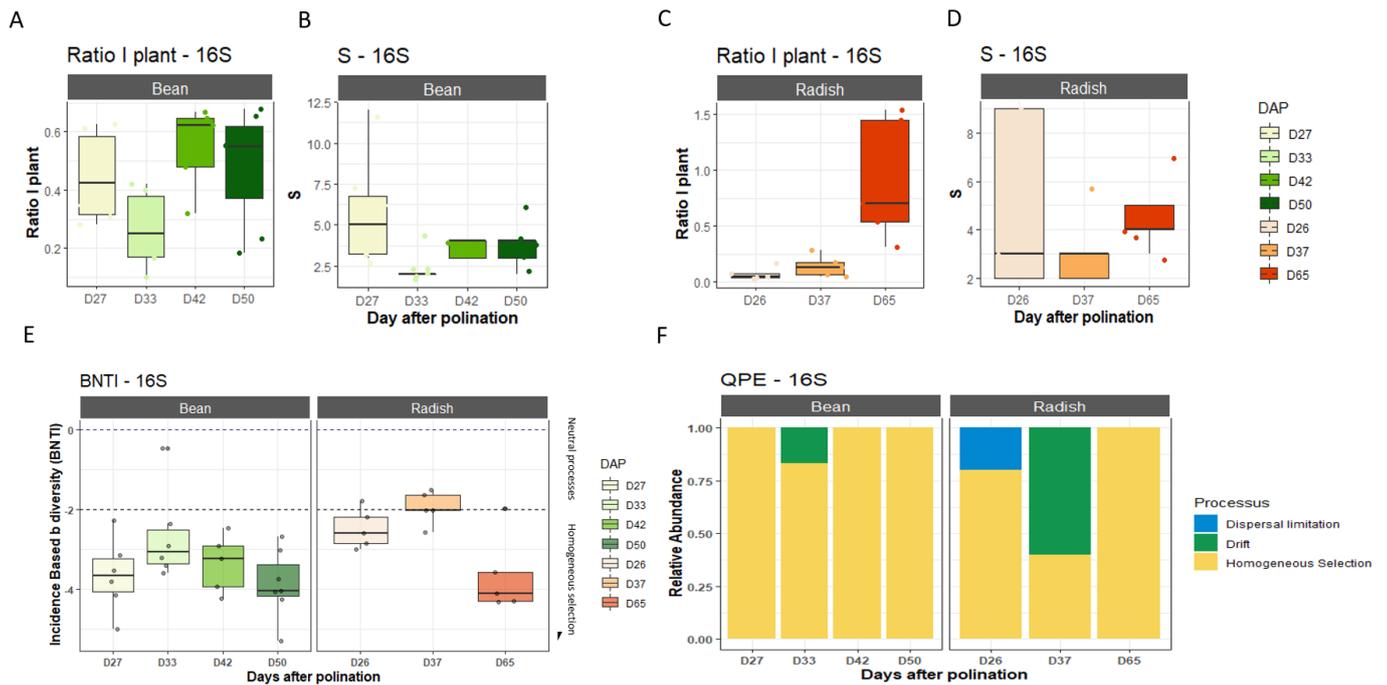
dynamics of the airborne samples over time was explaining 33.7% ( $P < 0.001$ ) of variability in phylogenetic composition (**Fig. S7C**). We also observed significant ( $P < 0.05$ ) variation in phylogenetic composition of bacterial communities associated with bean stem (23.0%) and radish stem (21.4%) over time (**Fig. S7C**). The percentage of seed taxa that were not detected in atmosphere, flowers and stems was at least higher than 80% for both plant species at each sampling time (**Fig. 4**). Overall, we detected more seed-associated ASVs in the atmosphere compared to the other habitats sampled (**Fig. 4**).

We next looked at the origin of the dominant taxa. The most frequent dominant ASV, *Pantoea agglomerans* (30% of all seeds with 289 occurrences, **Fig. S6**, was detected in all sampled habitats for both plant species. Although some taxa specifically associated with one specific plant (**Table S3**) were highly abundant in the stem (e.g. ASV5), this observation was not generalized to the whole, therefore suggesting distinct transmission routes (**Fig. S8**).

#### *Dispersion is less important than local seed processes*

Since dominant seed-associated taxa were specifically associated with one plant individual, proportions of observed ASVs within each seed were aggregated at the plant level to form a species-proportion distribution. We compared the resulting distribution with the observed species proportions predicted by an adapted neutral model (see Methods). Species-proportion distributions be considered as a first order approximation (Solé, Alonso and McKane 2002) for assessing the relative importance of dispersal over seed local processes (i.e. ecological drift or *Selection*) through the ratio  $I$  as well as the size  $S$  of the species pool available for these processes (see Methods).

Dispersion was less important than local seed processes in more than 85% of bean and radish plants. For bean, no clear pattern appeared over time but  $I$  was less important at D33 than at the following stages (**Fig. 5A and S9A**,  $P=0.003$  for 16S rRNA genes,  $P=0.063$  for *gyrB*). For radish,  $I$  increased significantly ( $P=0.012$  for 16S rRNA genes,  $P=0.05$  for *gyrB*) between D37 and D65 (**Fig. 5C and S9C**). The species pool size available for these processes was markedly low with median values ranging from 3-6 and 2-5 for bean and 2-6 and 3-4 for radish, for *gyrB* and 16S rRNA genes markers respectively (**Fig. 5B, 5D, S9B and S9D**). These results suggest that the balance between dispersion and local processes is shifted in time.



**Figure 5: Ecological processes involved in seed microbiota assembly. A-C.** The ratio  $I$  is used to estimate the relative importance of dispersal over seed internal processes (see Methods). **B-D.** Distribution of  $S$  (richness) as a function of the sampling day. **E.**  $\beta$ -nearest taxon index ( $\beta$ NTI) calculated to assess deviation from the null expectation. **F.** Relative importance of species-sorting (homogeneous selection), dispersal limitation or ecological drift in assembly of seed bacterial communities at the plant level. Analyses were performed with 16S rRNA genes (**D**). **A-B-C-D** were calculated at the individual seed level, while **E-F** at the plant level.

### *Selection drive local seed microbiota assembly at the plant level*

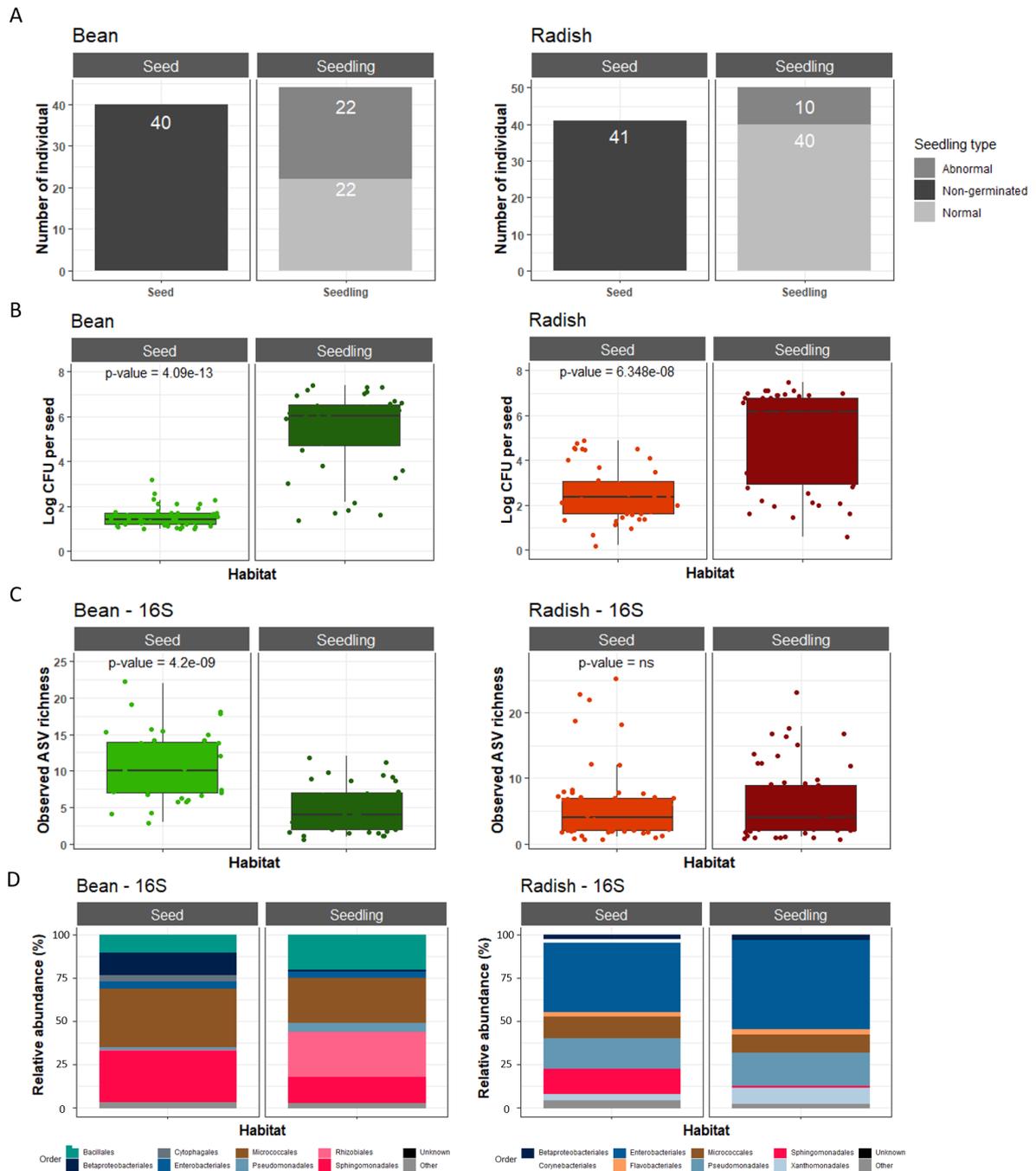
To estimate the relative importance of *Selection* and ecological drift in the local (e.g. plant level) assembly of the seed microbiota we employed null model or more specifically abundance-based  $\beta$ -null deviation measures (Stegen *et al.* 2013). With respect to the data obtained on bean seeds with 16S rRNA genes and *gyrB*,  $\beta$ -nearest taxon index ( $\beta$ NTI) values negatively deviated from the null expectation (**Fig. 5E** and **S9E**).  $\beta$ NTI values less  $< -2$  are considered as significantly different from the null expectation (Stegen *et al.* 2013). Since all  $\beta$ NTI values were below this threshold, this indicated that the phylogenetic composition of bean seed communities aggregated at the plant level are more similar than expected by chance and that this similarity could be driven by *Selection* (Vass *et al.* 2020).

Regarding the bacterial communities associated with radish seeds,  $\beta$ NTI values were distributed around  $-2$  with 16S rRNA genes and *gyrB* for the two first sampling stages and then less than  $-2$  at the final mature seed stage (**Fig. 5E** and **S9E**). Therefore, it seems that *Selection* had less influence on assembly of radish seed communities, at least on the early seed developmental stages, in comparison to bean seed communities. Thanks to quantitative process estimates (QPE) framework (Stegen *et al.* 2013), we were able to estimate the relative importance of other ecological processes during assembly of the seed microbiota. Based on this framework, it seems that ecological drift and dispersal limitation occurred during the early assembly stages (D26 and D37) of radish seed microbiota (**Fig. 5F** and **S9F**). At the late seed maturation stage of radish (D65), *Selection* became the principal process of community assembly (**Fig. 5F** and **S9F**).

### ***Experiment 3 – Seedling transmission of seed-borne taxa and their influence on seed vigour***

#### *Seed microbiota composition is influenced by leaf height*

In the previous section, we showed that individual seeds were colonized by a few bacterial taxa of variable identity. Part of the variation was explained by the individual plants. To gain more insight into the factors involved in this variability at the seed level, mature seeds from five individual plants were collected from eight fruits located at four different leaf heights for each plant species. Based on nested PERMANOVA performed on weighted UniFrac distance, leaf height inside each plant explained 12% and 11.8% of variation ( $P < 0.05$ , **Fig. S10A** and **S11A**) in bacterial



**Figure 6: Comparison of seed and seedling microbiota profiles.** **A.** Number of non-germinated seeds (dark grey), abnormal (grey) and normal seedling (light grey). **B.** Average bacterial population size (log<sub>10</sub> CFU) associated with seed and seedling. **C.** Average richness (estimated with 16S rRNA genes ASVs) in seed and seedling. **D.** Taxonomic profile (Order level - 16S rRNA genes) of seeds and seedlings microbiota. *P*-values were derived from a Wilcoxon rank sum test.

phylogenetic composition of bean and radish seeds, respectively. In contrast, we did not observe a significant pattern of richness and taxonomy according to the position of the seed according to the leaf height (**Fig. S10B-C** and **S11B-C**). We confirm here the hypothesis of a spatial heterogeneity of seed microbiota between plants but also within each plant individual.

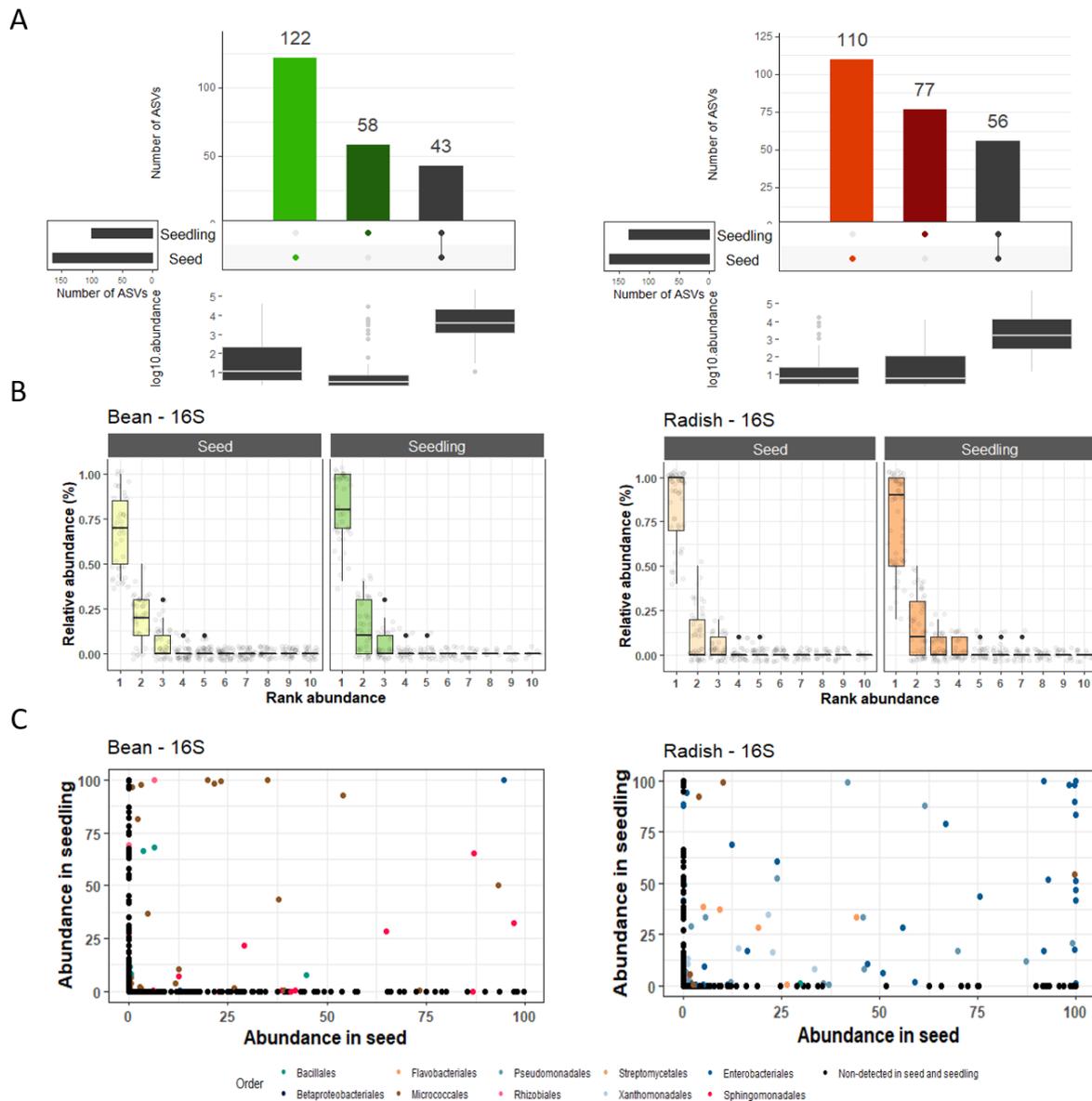
#### *Dynamics of seed microbiota during seedling emergence*

We next characterized which seed-borne bacterial taxa were transmitted to the seedling. Dynamics of the seed microbiota during emergence were analyzed in soil-less conditions using a non-destructive sampling procedure (see Methods), which makes it possible to monitor these dynamics at the level of individual seedling. We analyzed only the samples where CFU were recovered for seed and seedlings, therefore excluding non-germinating seeds or seeds without detectable CFU (**Fig. 6A**).

During transition from seed to seedling, median bacterial population size increased by 1.4 to 6.0 log<sub>10</sub> CFU in bean ( $P > 0.001$ ) and by 2.3 to 6.1 log<sub>10</sub> CFU in radish ( $P > 0.001$ ) (**Fig. 6B**). Increase in bacterial population size during emergence was associated with a significant decrease ( $P > 0.001$ ) in richness in bean (10 to 4 ASVs with 16S rRNA genes and *gyrB*). In contrast, no significant change in bacterial richness was detected in radish with both molecular markers (16S rRNA genes :  $P = 0.5898$  and *gyrB* :  $P = 0.1377$ ) (**Fig. 6C** and **S12**).

About one fifth (43 out of 223) and one quarter (56 out of 243) of the bacterial ASVs associated with bean and radish seeds were detected in seedlings using 16S rRNA genes (**Fig. 7A**). The use of *gyrB* reduced these proportions to 11% and 5.6% for bean and radish, respectively (**Fig. S13A**). Although seed-borne ASVs not detected in the seedlings were affiliated with a multitude of bacterial orders, Burkholderiales were almost never detected in seedlings of both plant species (**Fig. S14** and **S15**). More surprisingly some seedling-associated ASVs were not detected in seeds. The absence of CFU detection in our sterile experimental system (**Fig. S12A**) strongly suggested that these seedling-associated ASVs originated from seeds. Among these ASVs specifically associated with seedlings were numerous Bacillales and Rhizobiales for bean and multiple Pseudomonadales for radish (**Fig. S14** and **S15**).

*The initial abundance of seed-associated taxa does not explain its transmission to seedlings*



**Figure 7: Seed to seedling transmission.** **A.** Number of 16S rRNA genes ASVs specifically detected on seeds (light color), seedlings (dark color) or both habitats (black). **B.** Rank abundance curves of 16S rRNA genes ASVs in individual seeds and seedlings. **C.** Comparison of 16S rRNA genes ASV relative abundance in seed and seedling. Each dot corresponds to one ASV, which is colored according to its taxonomic affiliation at the Order level, black dots are ASV not detected in seed and seedling.

Since transmission of some seed-borne plant pathogens to seedling is explained by their initial populations sizes on seeds (Darsonval *et al.* 2009; Dutta *et al.* 2012). We investigated whether the relative abundance of seed-borne ASVs was a predictor of seedling transmission. As what had already been observed on experiment 2, each individual seed of both plant species was associated with one dominant ASV. The same pattern was observed for seedling, where one dominant ASV was associated with bean and radish seedlings (**Fig. 7B** and **S13B**).

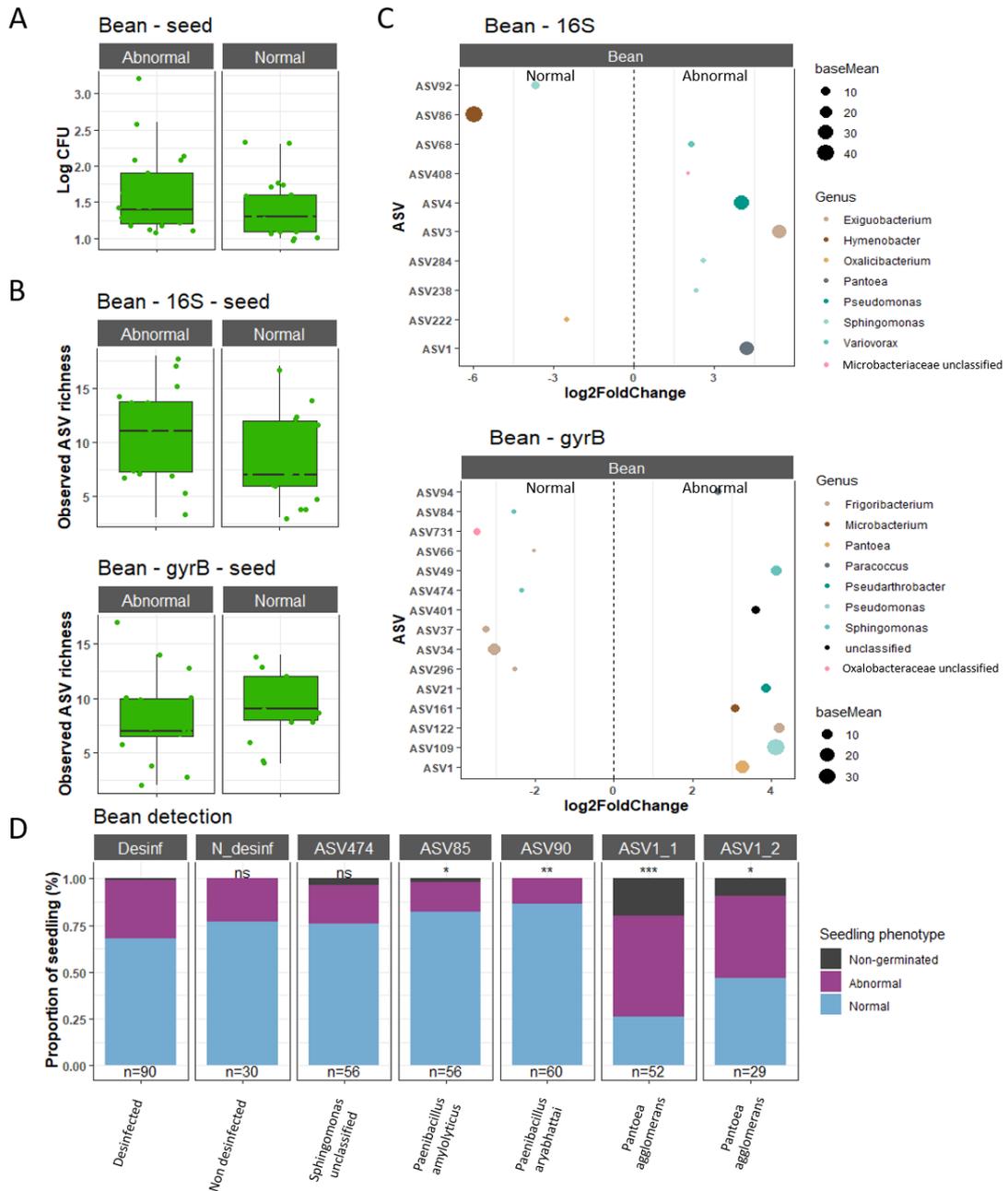
However, the dominant seed-borne ASV did not necessarily become dominant in the corresponding seedlings (**Fig. 7C** and **S13C**). Indeed, only 11 (out of 57) and six (out of 52) dominant seed-borne ASVs were also dominant on radish seedling according to 16S rRNA genes and *gyrB*, respectively. This value is even lower for bean with four 16S rRNA genes ASVs (out of 43) and one *gyrB* ASV, which were dominant in both habitats. Altogether these results suggest that the initial abundance of seed-borne taxa is not predictive of its transmission to seedlings as many rare seed-borne taxa become dominant on seedlings, especially in bean.

#### *The identity of the seed-borne taxa affected seedling fitness*

Since seeds are colonized by few taxa of variable identity, we investigated whether the identity of these ASVs could impact the first phases of crop establishment, namely germination and seedling emergence.

A high proportion of seeds (48% for bean, 45% for radish) did not germinate under our experimental conditions (**Fig. 6A**). Bacterial population size (**Fig. S16A**) and richness (**Fig. S16B** and **S16A**) were not significantly different between germinating and non-germinating seeds. Comparison of the relative abundance (RA) of seed-borne 16S rRNA genes ASVs in germinating and non-germinating seeds revealed significant increase ( $P < 0.01$ ,  $\log_2FC > 2$ ) in RA of six and three ASVs in non-germinating seeds of bean and radish, respectively (**Fig. S16 C**). However, according to the taxonomic affiliation at the genus level, none were found in common with the three and eight *gyrB* ASVs enriched in non-germinating seeds (**Fig. S17B**). Unfortunately, we were not able to recover representative bacterial strains for these enriched ASVs and therefore did not confirm the observed phenotype experimentally.

Once the seeds have germinated, the corresponding seedlings can be classified as normal or abnormal according to their morphologies (see Methods). By using this classification scheme,



**Figure 8: Impact of seed-borne ASVs on bean seedling phenotype. A.** Correspondence between initial bacterial population size ( $\log_{10}$  CFU) and seedling phenotype. **B.** Correspondence between observed richness on seeds and seedling phenotype. **C.** ASVs with significant changes in relative abundance ( $P < 0.01$ ) in normal and abnormal seedlings. Colors corresponded to taxonomic affiliation at the genus level. **D.** Proportion of non-germinated seeds, normal or abnormal seedling after seed inoculation of bacterial strains. All seeds were primarily disinfected before inoculation. Strains were representative of ASVs significantly associated with normal (ASV85 and ASV90) and abnormal seedlings (ASV1) or associated with both phenotypes (ASV474). Statistical tests were performed comparing proportion of normal and abnormal phenotype in disinfected seeds against each condition with Chi-squared test (ns = non-significant ; \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.01$  ; \*\*\* =  $P < 0.001$ ).

22 normal and 22 abnormal bean seedlings were obtained as well as 40 normal and 10 abnormal radish seedlings (**Fig. 6A**). Initial bacterial population size and richness observed on seeds were not good predictors of seedling phenotypes (**Fig. 8A** and **8B**). Changes in RA of seed-borne ASVs were next investigated in bean seeds but not in radish as few seeds produced abnormal seedlings, which does not allow for a balanced distribution. Overall, the RA of six 16S rRNA genes ASVs and eight *gyrB* ASVs were significantly enriched ( $P < 0.01$ ,  $\log_2FC > 2$ ) in seeds that produced abnormal seedlings (**Fig. 8C**). The taxonomic affiliation of four of these 16S rRNA genes and *gyrB* ASVs was in agreement at the genus-level (**Fig. 8C**). On the other hand, the RA of three 16S rRNA genes and seven *gyrB* ASVs were significantly enriched in seeds that produced normal seedlings (**Fig. 8C**).

To assess phenotype experimentally, we selected representative bacterial strains from our in-house bacterial collection, on the basis of their *gyrB* sequences and inoculated these strains on bean seeds (**Fig. 8D**). We selected strains representative of ASVs (i) significantly enriched in seeds that produced abnormal seedling (ASV1: *Pantoea agglomerans*), (ii) significantly enriched in seeds that produced normal seedling (ASV85: *Paenibacillus amylolyticus* and ASV90: *Bacillus aryabhatai*) and (iii) not significantly enriched (ASV474: *Sphingomonas* sp.). First, we validated that the seed surface-disinfection procedure employed did not impact seedling phenotype (**Fig. 8D**). As a control, seed inoculation of ASV474 did not induce any difference in seedling phenotype. In contrast seed-inoculation with two representative bacterial strains of ASV1 resulted in a significant ( $P < 0.05$ ) increase of abnormal seedling in comparison to surface sterilized seeds, mainly associated with rot symptoms. Inoculation of ASV85 and ASV90 increased the number of normal seedling (**Fig. 8D**). Hence, we confirmed the seedling phenotype expected based on the RA of ASVs.



**Discussion :**

The primary objective of this study was to estimate the bacterial diversity of individual seeds during their development. Using a culture-enrichment procedure for performing community profiling at the individual seed level, we observed a low bacterial richness with a median of seven and four bacterial ASVs detected per bean and radish seed, respectively. A dominant bacterial taxon (>75% of relative abundance) of variable identity (n=224 ASVs) was associated with each individual seed. These results confirmed that seed colonization of bacteria is bottlenecked and that only one dominant taxon is able to colonize the seed, which is in agreement with the primary symbiont hypothesis (Newcombe *et al.* 2018).

*Are the first microorganisms that colonize the seed during its development, the ones that will be established on mature seeds?* Overall, changes in community composition following colonization of a nearly sterile habitat (like seed) by micro-organisms is defined as primary succession (Fierer *et al.* 2010). Primary succession is influenced by two main processes : (i) change in limiting resource through time and (ii) the quantity of microorganisms that can colonize a habitat (Fierer *et al.* 2010). In the case of the seed habitat, the first of these processes is associated with change in seed metabolites level occurring which takes place during its development (Fait *et al.* 2006), in addition the impact of microorganisms themselves through their metabolic activity and their interactions with the host can impact primary succession (Vannette and Fukami 2014). The second process is intimately linked to the seed transmission routes employed by micro-organisms which will act as source of inoculum for the seed (Darrasse *et al.* 2018; Chesneau *et al.* 2020). Although the destructive sampling procedure employed in this work does not allow direct monitoring of the dynamics of the assembly of the microbiota during seed development, indirect evidence suggested a contrasting response depending on the plant species. For radish, bacterial phylogenetic diversity and taxonomic composition were stable over time suggesting that pioneer taxa were maintained during seed maturation. In contrast, increase in phylogenetic diversity together with shift in bacterial taxonomic composition during bean seed development indicated replacement of pioneer taxa during seed filling and maturation. Differences in succession profiles between plant species could be explained by differences in resource availability (ie : radish seeds are oleaginous whereas bean seeds are proteinous). This is an important process as demonstrated in soil, indeed soil with high nutrient supply was subjected to stronger priority effect than low nutrient supply (Kardol, Souza and Classen 2013). Moreover, seed-associated dominant taxa in radish seeds were half as numerous as those in bean, therefore, highlight one other potential



explanation being that in radish seeds, microbial taxa are subjected to stronger competitive pressure, therefore, more prone to priority effects (Fukami 2015; Sarneel, Kardol and Nilsson 2016). As referred earlier seed transmission routes employed by microorganisms drive primary succession (Chesneau *et al.* 2020) and are essential to study in order to better understand seed microbiota assembly.

*What are the main seed transmission routes?* Early seed colonizers employed two main routes: an internal seed transmission pathway *via* vascular tissues and a floral pathway that corresponds to the colonization of reproductive tissues by airborne inoculum (Maude 1996) or pollinators (Prado *et al.* 2020). It is difficult to specify the relative importance of these two pathways in the initial colonization of bean and radish seeds by bacterial taxa. Indeed, less than 20% of seed-borne taxa were detected in atmosphere, flowers and stems, which probably reflected an under-sampling of these source habitats in comparison to seeds. A recent study has shown that approximately 10% and 40% of seed-borne taxa were derived from the floral pathway in bean and radish, respectively (Chesneau *et al.* 2020). In our study, the weak co-occurrence of bacterial ASVs in bean flower and seed confirmed that the floral pathway is of limited importance in bean. However, inoculation of flowers with plant pathogens such as *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* does lead to its transmission to the seed via the floral route, meaning that adapted microbial inoculant can be incorporated into the seed via floral pathway (Darrasse *et al.* 2018). This difference in seed transmission pathways observed between plant species can be due to differences in pollination modes, radish being allogamous and bean autogamous (Chesneau *et al.* 2020). However, this hypothesis needs to be investigated experimentally. Regardless of the origin of early seed colonizers, significant variations in the identity of these taxa were observed between plant individuals. This inter-individual variation has already been observed in seed microbial communities of radish (Rezki *et al.* 2018) and likely reflects spatial heterogeneity of the distribution of micro-organism within the plot (Mony *et al.* 2020). Spatial heterogeneity was also observed at the infra-individual level since variation in seed bacterial phylogenetic composition was significantly influenced by leaf height for both plant species. Therefore, seed microbiota assembly is probably under the influence of nested spatial scale structure (Mony *et al.* 2020). Note that the entire study was performed after collecting the seeds aseptically from the fruits. In an agricultural ecosystem, mature seeds are collected mechanically and mixed with plant residuals (ie : fruits residues). Therefore, microbial colonization of the seeds occurs and can impact the epiphyte composition of the seed microbiota. It has been shown that the location of seeds in relation to



residues can be an important factor in seed microbiota colonisation and early crop health (Wuest, Albrecht and Skirvin 2000).

*What are the ecological processes involved in the assembly of the microbiota at the individual seed level?* According to our neutral model, the relative importance of local replacement rate (*Selection* or ecological drift) was higher than immigration rate for both plant species during seed development. For bean, *Selection* was the main driver of community assembly throughout the entire seed development. It is likely that selection of pioneer taxa relies on host defense responses. Indeed, bypassing the activation of plant defenses genes is key for seed transmission of *X. citri* pv. *fuscans* by the internal pathway (Darsonval *et al.* 2009)). Moreover, activation of *Medicago truncatula* defense response is observed during seed filling following inoculation of *X. campestris* pv. *campestris* (Terrasson 2015). In the later stages of seed development, we observed a replacement of pioneer taxa. As stated earlier, this primary succession could be due to changes in quantity and quality of organic carbon sources. In *Fabaceae*, seed filling is associated with an increase of sucrose-to-hexose ratio (Weber, Borisjuk and Wobus 2005), while seed maturation is characterized by an accumulation of Raffinose Family Oligosaccharides (RFO) at the expense of sucrose (Verdier, Leprince and Buitink 2019). Others factors such as a sharp decrease of water availability during seed maturation (Leprince *et al.* 2017) can also have an important influence on the succession dynamics. For radish, the relative importance of the different ecological processes analyzed (selection, ecological drift and dispersal) is less clear. Indeed,  $\beta$ NTI values were scattered on both sides of the threshold -2 that is considered as significantly different from the null expectation. It is therefore likely that selection is less important in radish than in bean during seed development and that ecological drift is involved in the replacement rate observed. If this assumption is correct, this would be consistent with the results obtained by Rezki and coworkers (Rezki *et al.* 2018), where drift was reported as the key ecological process during bacterial community assembly of mature seeds of radish.

*Was the initial abundance of seed-borne taxa a good predictor of their transmission to seedlings ?* It is widely acknowledged that seed-borne taxa are not necessarily transmitted to seedlings (Baker and Smith 1966). Seed borne bacterial population size is one parameter, which could be involved in the efficiency of transmission to seedlings. For instance, a minimum population size of  $10^3$  CFU per bean seed is required for an effective seedlings contamination by *X. citri* pv. *fuscans* (Darrasse *et al.* 2007). According to the data obtained in the course of this work the population size was not a strong predictor of seedlings transmission for neither of the two



plant species studied. This is in agreement with recent results obtained on rapeseed, where rare seed-borne or soil-borne taxa were efficiently transmitted to seedlings (Rocheftort *et al.* 2021). As the initial inoculum size does not guarantee successful transmission to seedlings, then the difference in fitness between taxa (*Selection*) appears as a major driver of assembly of the seedling microbiota. Competition for resources and spaces between bacterial taxa could be responsible for the selection of taxa in seedlings. Indeed, after imbibition of the seed, a wide range and quantity of primary and secondary metabolites are exuded (e.g. Nelson 2004; Schiltz *et al.* 2015). Labile substrates will be consumed first, which will favor copiotrophic taxa. These copiotrophic taxa are indeed reported as dominant in seedlings of bean and radish (Torres-Cortés 2018). However, it should be noted that dominant ASVs associated with seedlings were not exclusively affiliated to species with high growth rates (e.g. *Rhizobium* sp.). Hence, it is highly likely that other traits allow these populations to establish on seedlings. Another interesting observation was that some of the dominant taxa in the seedlings were not found in the corresponding seeds. Community profile of a significant portion of collected seeds (bean 32%, radish 42%) could not be estimated as no CFU was detected on the culture medium employed, an observation already reported for seeds of several plant species (Mundt and Hinkle 1976). Could the seeds without detectable colonies be considered as sterile? This is unlikely as CFUs were systematically obtained on each corresponding seedling, which justifies the use of seedlings for the detection of specific plant pathogens in the seed industry (a procedure called grow-out test (Gitaitis and Walcott 2007)). Alternatively, it is likely that some seed-associated bacterial populations were in a state of viable but nonculturable (VBNC), which corresponds to a low metabolic activity state without formation of colonies on standard culture media. VBNC has been described in a number of seed-transmitted bacteria including *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*<sup>32</sup> and *Acidovorax citrulli* (Jiang *et al.* 2016; Kan *et al.* 2019). Why some populations enter the VBNC state in seeds and what are the signals that lift this state during germination-emergence are not yet known.

*What is their impact of dominant seed-borne taxa on seed vigour ?* In our study, overall seed microbiota structure and bacterial biomass did not influence seed vigor. However, we identified changes in RA of some specific ASVs in seeds that are correlated to non-germinating seeds or abnormal seedling. Moreover, we were able to validate the impact of seed-borne bacterial strains representative of these ASVs on seedling phenotype. Indeed, seed-inoculation of two bacterial strains affiliated to *Paenibacillus amylolyticus* and *Bacillus* resulted in an increase of normal seedling. Firmicutes are well known for their beneficial impact on plant growth. For



instance seed-borne *Bacillus* species (Khalaf and Raizada 2016; Pitzschke 2016), and *Paenibacillus* species (Díaz Herrera *et al.* 2016) are known to significantly impact the seedling phenotype. In contrast, representative strains of *Pantoea agglomerans* (ASV1) caused an abnormal seedling phenotype, notably through root rot. *P. agglomerans* is a core seed microbiome taxon, highly abundant and observed in almost all plant species studied to date (Simonin *et al.* 2021). In bean, the occurrence of this taxa gradually decreased during seed filling and maturation. Therefore, symptoms caused on seedlings by *P. agglomerans* could occur when succession during seed development is not able to induce a low population level of this bacterial species.

### **Conclusion / Perspectives :**

This study provides key descriptive insights into the assembly of the seed microbiota, the identification of the origin of seed-associated taxa, the microbial transmission from the seed to the seedling and the impact of seed borne taxa on seedling phenotype. These findings will help in the design of seed microbiota engineering strategies by selecting (i) the most permissive seed transmission pathways and (ii) plant beneficial bacteria that improve crop establishment. However, future studies will need to focus on the understanding of the mechanisms involved in seed microbial succession, especially at the community scale. These studies would provide essential information to efficiently manipulate seed microbiome to increase crop sustainability and productivity. We identified Selection as the main driver of seed community assembly, therefore seed microbiota composition and microbial functions could be taken into account into breeding programs. However, to date, the nature(s) of these selective processes remained to be explored. A future promising avenue would be to combine plant breeding efforts with seed microbiota engineering to maximize the benefits on plant health.

### **Acknowledgments :**

This work was supported by the French National Research Agency [ANR-17-CE20-0009-01]. The authors wish to thank Emmanuelle Laurent and Vincent Odeau (FNAMS) for field crop management as well as Muriel Bahut (ANAN platform, SFR Quasav) for amplicon sequencing.

### **Conflict of interest :**

The authors declare no conflict of interests

### **References :**



1. Shade, A., Jacques, M.-A. & Barret, M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology* 37, 15–22 (2017).
2. Goggin, D. E., Emery, R. J. N., Kurepin, L. V. & Powles, S. B. A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Ann Bot* 115, 293–301 (2015).
3. Escobar Rodriguez, C., Antonielli, L., Mitter, B., Trognitz, F. & Sessitsch, A. Heritability and functional importance of the *Setaria viridis* L. bacterial seed microbiome. *Phytobiomes Journal* (2019) doi:10.1094/PBIOMES-04-19-0023-R.
4. Chen, M.-H., Jack, A. L. H., McGuire, I. C. & Nelson, E. B. Seed-colonizing bacterial communities associated with the suppression of *Pythium* seedling disease in a municipal biosolids compost. *Phytopathology* 102, 478–489 (2012).
5. Ridout, M. E., Schroeder, K. L., Hunter, S. S., Styer, J. & Newcombe, G. Priority effects of wheat seed endophytes on a rhizosphere symbiosis. *Symbiosis* 78, 19–31 (2019).
6. Matsumoto, H. *et al.* Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice. *Nat. Plants* (2021) doi:10.1038/s41477-020-00826-5.
7. Chesneau, G. *et al.* Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiol Ecol* (2020) doi:10.1093/femsec/fiaa190.
8. Simonin, M. *et al.* Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *bioRxiv* 2021.06.08.447541 (2021) doi:10.1101/2021.06.08.447541.
9. Yang, L. *et al.* Dominant Groups of Potentially Active Bacteria Shared by Barley Seeds become Less Abundant in Root Associated Microbiome. *Front. Plant Sci.* 8, (2017).
10. Klaedtke, S. *et al.* Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages: Terroir shapes the seed microbiota. *Environmental Microbiology* 18, 1792–1804 (2016).
11. Rochefort, A. *et al.* Influence of environment and host plant genotype on the structure and diversity of the *Brassica napus* seed microbiota. *Phytobiomes Journal* (2019) doi:10.1094/PBIOMES-06-19-0031-R.
12. Kim, W.-I. *et al.* Inhibition of *Salmonella enterica* growth by competitive exclusion during early alfalfa sprout development using a seed-dwelling *Erwinia persicina* strain EUS78. *International Journal of Food Microbiology* 312, 108374 (2020).



13. Bergna, A. *et al.* Tomato Seeds Preferably Transmit Plant Beneficial Endophytes. *Phytobiomes Journal* 2, 183–193 (2018).
14. Morales Moreira, Z. P., Helgason, B. L. & Germida, J. J. Crop, genotype, and field environmental conditions shape bacterial and fungal seed epiphytic microbiomes. *Can J Microbiol* (2020) doi:10.1139/cjm-2020-0306.
15. Prado, A., Marolleau, B., Vaissière, B. E., Barret, M. & Torres-Cortes, G. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Scientific Reports* 10, 1–11 (2020).
16. Rezki, S. *et al.* Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil* 422, 67–79 (2018).
17. Mundt, J. O. & Hinkle, N. F. Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 694–698 (1976).
18. Gitaitis, R. & Walcott, R. The Epidemiology and Management of Seedborne Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 45, 371–397 (2007).
19. Newcombe, G., Harding, A., Ridout, M. & Busby, P. E. A Hypothetical Bottleneck in the Plant Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 9, (2018).
20. Bintarti, A. F., Sulesky-Grieb, A., Stopnisek, N. & Shade, A. Endophytic microbiome variation among single plant seeds. *Phytobiomes Journal* 2021.04.27.441449 (2021) doi:10.1101/2021.04.27.441449.
21. Fort, T. *et al.* Maternal effects shape the seed mycobiome in *Quercus petraea*. *New Phytologist* 230, 1594–1608 (2021).
22. Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Schena, L. & Tack, A. J. M. Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environmental Microbiology* 23, 2199–2214 (2021).
23. Baker, K. F. & Smith, S. H. Dynamics of Seed Transmission of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 4, 311–332 (1966).
24. Barret, M. *et al.* Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1257–1266 (2015).



25. Torres-Cortés, G. Functional Microbial Features Driving Community Assembly During Seed Germination and Emergence. *Frontiers in Plant Science* 9, (2018).
26. Rochefort, A. *et al.* Transmission of Seed and Soil Microbiota to Seedling. *mSystems* 6, e00446-21 (2021).
27. Caruso, V., Song, X., Asquith, M. & Karstens, L. Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass. *mSystems* 4, (2019).
28. Fargier, E. & Manceau, C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 56, 805–818 (2007).
29. Kurowski, C. & Remeus, P. M. Proposal for a new method for detecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on bean seeds. 1–12 (2007).
30. Sutton, S. Accuracy of Plate Counts. *Microbiology Topics* 17, 42–46 (2011).
31. Caporaso, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* 108, 4516–4522 (2011).
32. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12 (2011).
33. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581–583 (2016).
34. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73, 5261–5267 (2007).
35. McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8, e61217 (2013).
36. Schliep, K. P. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593 (2011).
37. Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A. & Callahan, B. J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6, 226 (2018).



38. Lozupone, C. & Knight, R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228–8235 (2005).
39. Oksanen, J. *et al.* vegan: Community Ecology Package version 2.5-6 from CRAN. <https://rdr.io/cran/vegan/> (2017).
40. Kindt, R. BiodiversityR. Package for Community Ecology and Suitability Analysis. <https://cran.r-project.org/web/packages/BiodiversityR/index.html>. (2015).
41. Conway, J. R., Lex, A. & Gehlenborg, N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33, 2938–2940 (2017).
42. Letunic, I. & Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44, W242–W245 (2016).
43. Fine, P. V. A. & Kembel, S. W. Phylogenetic community structure and phylogenetic turnover across space and edaphic gradients in western Amazonian tree communities. *Ecography* 34, 552–565 (2011).
44. Stegen, J. C. *et al.* Quantifying community assembly processes and identifying features that impose them. *The ISME Journal* 7, 2069–2079 (2013).
45. Solé, R. V., Alonso, D. & McKane, A. Self-organized instability in complex ecosystems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357, 667–681 (2002).
46. ISTA, International Rules for Seed Testing. in vol. 2015 Chapter 5, i-5-56 (60) (2015).
47. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550 (2014).
48. Zhang, J. *et al.* High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota. *Nat Protoc* 16, 988–1012 (2021).
49. Maude, R. B. Seedborne diseases and their control: principles and practice. *Seedborne diseases and their control: principles and practice*. (1996).
50. Vass, M., Székely, A. J., Lindström, E. S. & Langenheder, S. Using null models to compare bacterial and microeukaryotic metacommunity assembly under shifting environmental conditions. *Sci Rep* 10, 2455 (2020).



51. Darsonval, A. *et al.* Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *MPMI* 22, 747–757 (2009).
52. Dutta, B., Avci, U., Hahn, M. G. & Walcott, R. R. Location of *Acidovorax citrulli* in Infested Watermelon Seeds Is Influenced by the Pathway of Bacterial Invasion. *Phytopathology* 102, 461–468 (2012).
53. Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R. & Craine, J. M. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* 161, 635–642 (2010).
54. Fait, A. *et al.* *Arabidopsis* Seed Development and Germination Is Associated with Temporally Distinct Metabolic Switches. *Plant Physiology* 142, 839–854 (2006).
55. Vannette, R. L. & Fukami, T. Historical contingency in species interactions: towards niche-based predictions. *Ecol Lett* 17, 115–124 (2014).
56. Darrasse, A., Barret, M., Cesbron, S., Compant, S. & Jacques, M.-A. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant and Soil* 422, 115–128 (2018).
57. Kardol, P., Souza, L. & Classen, A. T. Resource availability mediates the importance of priority effects in plant community assembly and ecosystem function. *Oikos* 122, 84–94 (2013).
58. Fukami, T. Historical Contingency in Community Assembly: Integrating Niches, Species Pools, and Priority Effects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 46, 1–23 (2015).
59. Sarneel, J. M., Kardol, P. & Nilsson, C. The importance of priority effects for riparian plant community dynamics. *Journal of Vegetation Science* 27, 658–667 (2016).
60. Mony, C., Vandenkoornhuyse, P., Bohannan, B. J. M., Peay, K. & Leibold, M. A. A Landscape of Opportunities for Microbial Ecology Research. *Front. Microbiol.* 11, (2020).
61. Wuest, S. B., Albrecht, S. L. & Skirvin, K. W. Crop residue position and interference with wheat seedling development. *Soil and Tillage Research* 55, 175–182 (2000).
62. Terrasson, E. Identification of a molecular dialogue between developing seeds of *Medicago truncatula* and seedborne xanthomonads. *Journal of Experimental Botany* 66, 3737–3752 (2015).



63. Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U. Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annual Review of Plant Biology* 56, 253–279 (2005).
64. Verdier, J., Leprince, O. & Buitink, J. A physiological perspective of late maturation processes and establishment of seed quality in *Medicago truncatula* seeds. in *The Model Legume Medicago truncatula* 44–54 (John Wiley & Sons, Ltd, 2019). doi:10.1002/9781119409144.ch05.
65. Leprince, O., Pellizzaro, A., Berriri, S. & Buitink, J. Late seed maturation: drying without dying. *J Exp Bot* 68, 827–841 (2017).
66. Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C. E. & Jacques, M.-A. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur J Plant Pathol* 119, 203–215 (2007).
67. Nelson, E. B. Microbial Dynamics and Interactions in the Spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42, 271–309 (2004).
68. Schiltz, S. *et al.* A review: what is the spermosphere and how can it be studied? *Journal of Applied Microbiology* 119, 1467–1481 (2015).
69. Jiang, N. *et al.* 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 (2016).
70. Kan, Y. *et al.* Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. *Front. Microbiol.* 10, (2019).
71. Pitzschke, A. Developmental Peculiarities and Seed-Borne Endophytes in Quinoa: Omnipresent, Robust Bacilli Contribute to Plant Fitness. *Front. Microbiol.* 7, (2016).
72. Khalaf, E. M. & Raizada, M. N. Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family. *BMC Microbiol* 16, 131 (2016).
73. Díaz Herrera, S., Grossi, C., Zawoznik, M. & Groppa, M. D. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research* 186–187, 37–43 (2016).



### **Author contributions**

G.C. and M.Ba. designed the study program. G.C., B.L., M.S. and M.Ba wrote the manuscript. G.C., M.S., A.P., C.M. and B.M. designed and did the experimental part of the study. G.C., M.B and M.Ba. wrote all computational pipelines with the exception of the “*analysis of species-proportion distributions*”. The neutral model of this latter section was designed and written by B.L. All authors contributed to the editing and final revision of the manuscript.

### **Data availability**

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the European Nucleotide Archive under the accession number PRJEB45079

### **Code availability**

All R scripts employed in this work are available on GitHub ([https://github.com/martialbriand/IRHS\\_EmerSys](https://github.com/martialbriand/IRHS_EmerSys))



## Supplementary method

### Species-proportion distribution analysis

We performed a qualitative analysis of the species-proportion distributions for both plant species. We focused on species thought to be actually representative of within seed microbiota, so microbial species whose abundance was less than 1% of the total abundance detected in one seed were discarded.

For each day and each plant, we computed the *empirical moments* of the observed ASV proportions. When considering the set of all ASV observed on a plant, only a few of them are detected in each seed. This is probably caused by censoring induced by the measurement process, but it probably also comes from spatial heterogeneity. This is why we computed the ASV proportions ( $f$ ) for each seed related to the ASVs detected on that seed, and discarded the null frequencies for unobserved ASVs. Defining  $I_{plant}$  and  $J_{seed}$  as the set of seeds observed at a given date on a given plant and the set of ASV *observed at least one time* in this seed on that plant at the same date respectively, we obtain for each plant the following expressions for the first three empirical moments

$$\overline{m}_{1,2,3}_{plant} = \sum_{i \in I_{plant}} \frac{1}{|I_{plant}|} \sum_{j \in J_i} \frac{f_{ij}^{1,2,3}}{|J_i|}$$

We compared these moments with those obtained with a neutral distribution derived from [Solé 2002]. These authors proposed the use of neutral distribution as a crude first order approximation of the species-abundance distributions in complex ecosystems. This distribution is the stationary distribution of a neutral model, involving local species communities (for us, a microbial community associated to a seed in a plant) and a “local” regional pool (for us, a plant associated community in the vicinity of a seed). Here, neutrality is taken in the sense of (Laroche *et al.* 2020), that is (i) local per capita rates of birth and death are identical for all individuals, whatever their species, (ii) immigration in the local community occurs through random sampling of individuals from the regional pool, (iii) all these rates depend on the local community size only. Moreover, it is assumed in this model that the local community is saturated (constant size  $N > 0$ ), and the typical local species pool size (the number of ASV available for immigration from the plant and its close environment in the vicinity of a seed) is  $S > 0$ .



Two phenomena are accounted for, immigration (probability  $\mu$ , such that  $0 < \mu < 1$ ) and local competition, modelled through a parameter  $C$ , representing the percentage of ASV with which an ASV competes, with equal probability to win. This parameter is also called the connectivity of the local community. The corresponding probability to win is  $C^* = 1 - (1 - C)^2$ .

Standard results in ecological theory (see (Laroche *et al.* 2020) for a review) lead to the definition of the ratio of the per capita immigration rate ( $\mu$ ) over the per capita replacement rate ( $(1 - \mu)C^*/(N_c - 1)$ ) in a community (seed)  $c$  of size  $N_c$ .

$$I_c = \frac{\mu}{(1 - \mu)C^*} (N_c - 1)$$

This is the relevant ecological parameter in these models, measuring the relative strength of immigration and internal competition or selection dynamics that shape the species abundance in the community, together with the local species pool size  $S$ . The species abundance distribution  $P$  is then given by a Beta-binomial distribution with parameters  $N_c, \alpha_c, \beta_c$  expressed as

$$\alpha_c = \frac{I_c}{S}, \quad \beta_c = I_c \frac{(S - 1)}{S}, \quad \mathbb{P}\mathbf{Bb}(n) = \binom{N_c}{n} \frac{\Gamma(n + \alpha_c)\Gamma(N_c - n + \beta_c)}{\Gamma(N_c + \alpha_c + \beta_c)} \frac{\Gamma(\alpha_c + \beta_c)}{\Gamma(\alpha_c)\Gamma(\beta_c)}$$

**We modified this model to compute the species-abundance distribution at the plant level for a given day.** To this end, we hypothesized that for seeds in which at least one microbe was detected, the distribution of total number of detected ASVs in all seeds was an acceptable proxy of the distribution of  $N_c$  accounting for natural variability and variability induced by the sampling process, but ignoring cultivation bias. Moreover, after inspection of the data, we assumed that for each observation date  $d$

$$N_c \sim \text{uniform}(N_{\min d}, N_{\max d})$$

where  $N_{\min d}, N_{\max d}$  depends on the sampling date but are the same for all plants.

Therefore, the marginal species abundance distribution at date  $d$  for seeds of plant  $p$  is given by

$$\bar{P}_{N_{\min d}, N_{\max d}, S, \frac{\mu}{(1-\mu)C^*}}(n) = \sum_{N>0, N \geq n} \mathbb{P}\mathbf{Bb}(n|N, S, \frac{\mu}{(1-\mu)C^*}) \mathbb{P}\mathbf{unif}(N|N_{\min d}, N_{\max d})$$

where  $\mathbb{P}\mathbf{Bb}$  and  $\mathbb{P}\mathbf{unif}$  are the Beta-binomial and uniform (on integer) probability functions.

We may notice that the model actually depends on the ratio  $R = \frac{\mu}{(1-\mu)C^*}$  and the parameter  $S$  and  $N_{\min d}, N_{\max d}$ . As we actually only observe proportions of ASVs present within each seed, we



compute the three first moments of positive proportion distribution at the plant level for this model:

$$\begin{aligned}
 m_1 &= E(f|1 \geq f > 0) = \sum_{n>0} f \sum_{N>0, \frac{n}{N}=f} \frac{\mathbb{P}\mathbf{Bb}(n|N, S, R)}{(\mathbf{1} - \mathbb{P}\mathbf{Bb}(0|N, S, R))} \mathbb{P}\mathbf{unif}(N|N_{\min d}, N_{\max d}) \\
 &= \sum_{N>0} \left( \sum_{N \geq n > 0} \frac{n}{N} \frac{\mathbb{P}\mathbf{Bb}(n|N, S, R)}{(\mathbf{1} - \mathbb{P}\mathbf{Bb}(0|N, S, R))} \right) \mathbb{P}\mathbf{unif}(N|N_{\min d}, N_{\max d}) \\
 &= \sum_{N>0} \frac{\mathbf{1}/S}{(\mathbf{1} - \mathbb{P}\mathbf{Bb}(0|N, S, R))} \mathbb{P}\mathbf{unif}(N|N_{\min d}, N_{\max d}) \\
 m_{2,3} &= E(f^{2,3}|f > 0) = \sum_{N>0} \left( \sum_{N \geq n > 0} \left(\frac{n}{N}\right)^{2,3} \frac{\mathbb{P}\mathbf{Bb}(n|N, S, R)}{(\mathbf{1} - \mathbb{P}\mathbf{Bb}(0|N, S, R))} \right) \mathbb{P}\mathbf{unif}(N|N_{\min d}, N_{\max d})
 \end{aligned}$$

Based on this model, for each date we used the total number of ASVs to choose  $N_{\min d}, N_{\max d}$  separately. After plotting the quantiles for each date, we observed that we could reasonably assume a uniform distribution on the interval corresponding to the 0.1 and 0.9 quantiles. Then, for a given set of parameters we simulated 1000 values of  $N$  and computed the moments according to the above formula.

We performed a **generalized moment estimation** of the parameters  $(S, R)$  to fit the observed moments for each plant. For this we screened the following parameter grid (whose range was selected by preliminary trial):

$$S = \{2, 3, \dots, 99, 100\},$$

$$R = \{0.000001, 0.000002, 0.000003, \dots, 0.000248, 0.000249, 0.00025\}$$

and selected for each plant the set of parameters that minimize the quantity

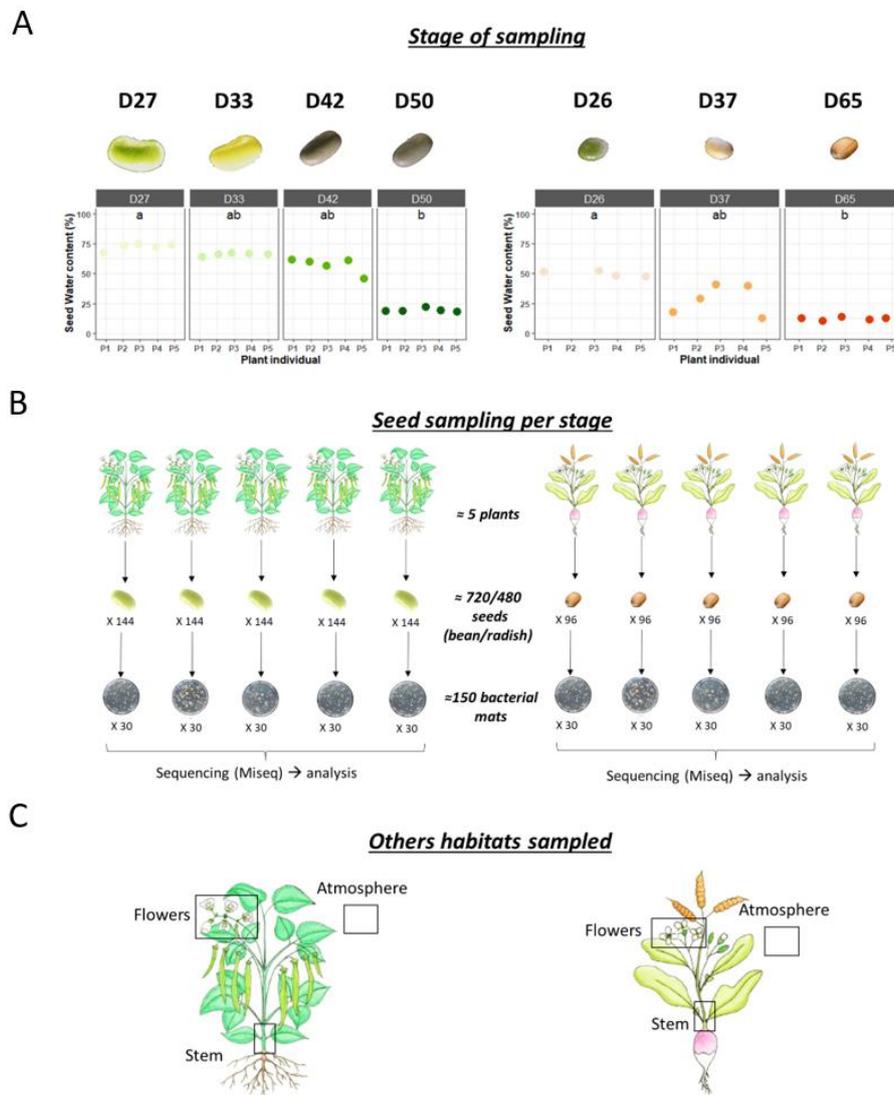
$$\sqrt{(m_{1obs} - m_1)^2 + (m_{2obs} - m_2)^2 + (m_{3obs} - m_3)^2}$$

We also tested a weighted version of this criterion, under the form

$$\sqrt{\left(\frac{m_{1obs} - m_1}{m_{1obs}}\right)^2 + \left(\frac{m_{2obs} - m_2}{m_{2obs}}\right)^2 + \left(\frac{m_{3obs} - m_3}{m_{3obs}}\right)^2}$$

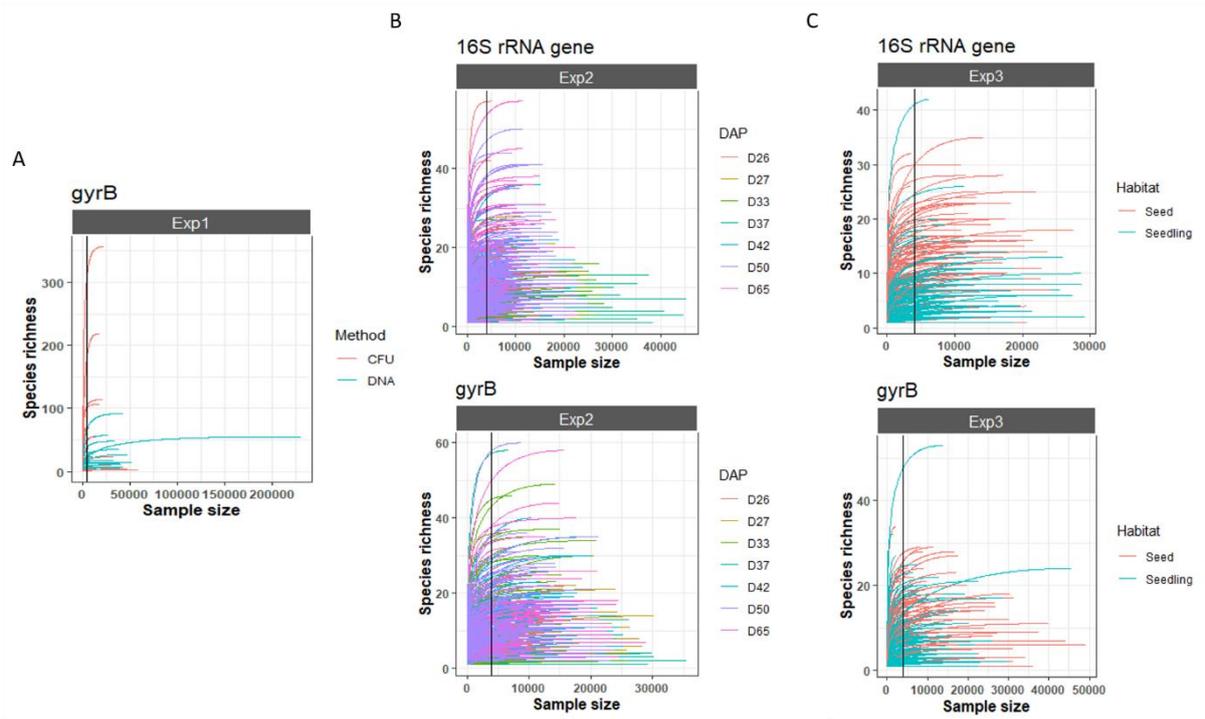
The empirical and estimated probability densities of proportions for each day and each plant were tested and plotted for bean and radish with 16S marker (**FigSs1**).





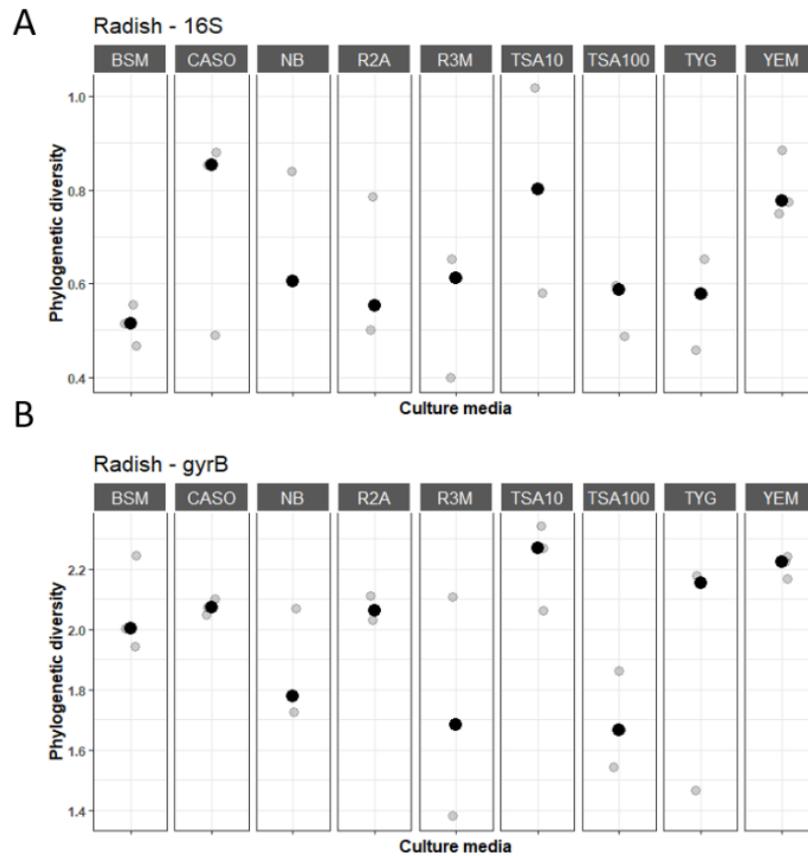
**Figure S1: Experimental design used to monitor the assembly of bacterial communities during seed development.** **A.** Seed water content (%) associated with samples collected during bean (left) and radish (right) seed development. Letters denote significance evaluated from Kruskal-Wallis following Dunn test *post hoc* ( $P < 0.01$ ) **B.** Number of samples processed at each stage. **C.** Sampling of flowers, stems and atmosphere, which could represent the main inoculum sources for seed taxa.





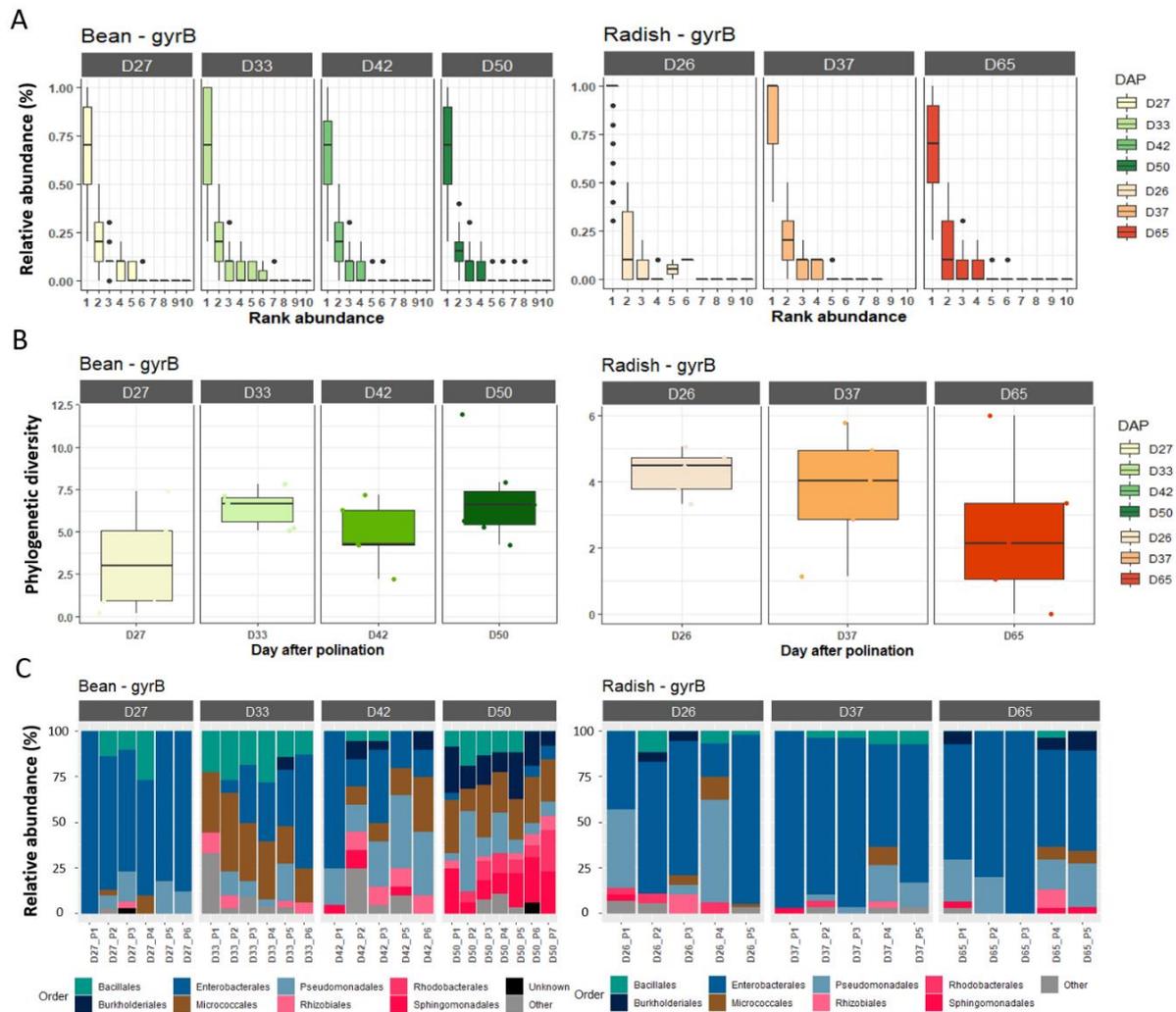
**Figure S2: Rarefaction curves for all data sets. A.** data set 1 **B.** data set 2 **C.** data set3. Black vertical lines correspond to a rarefaction threshold of 4 000 reads.





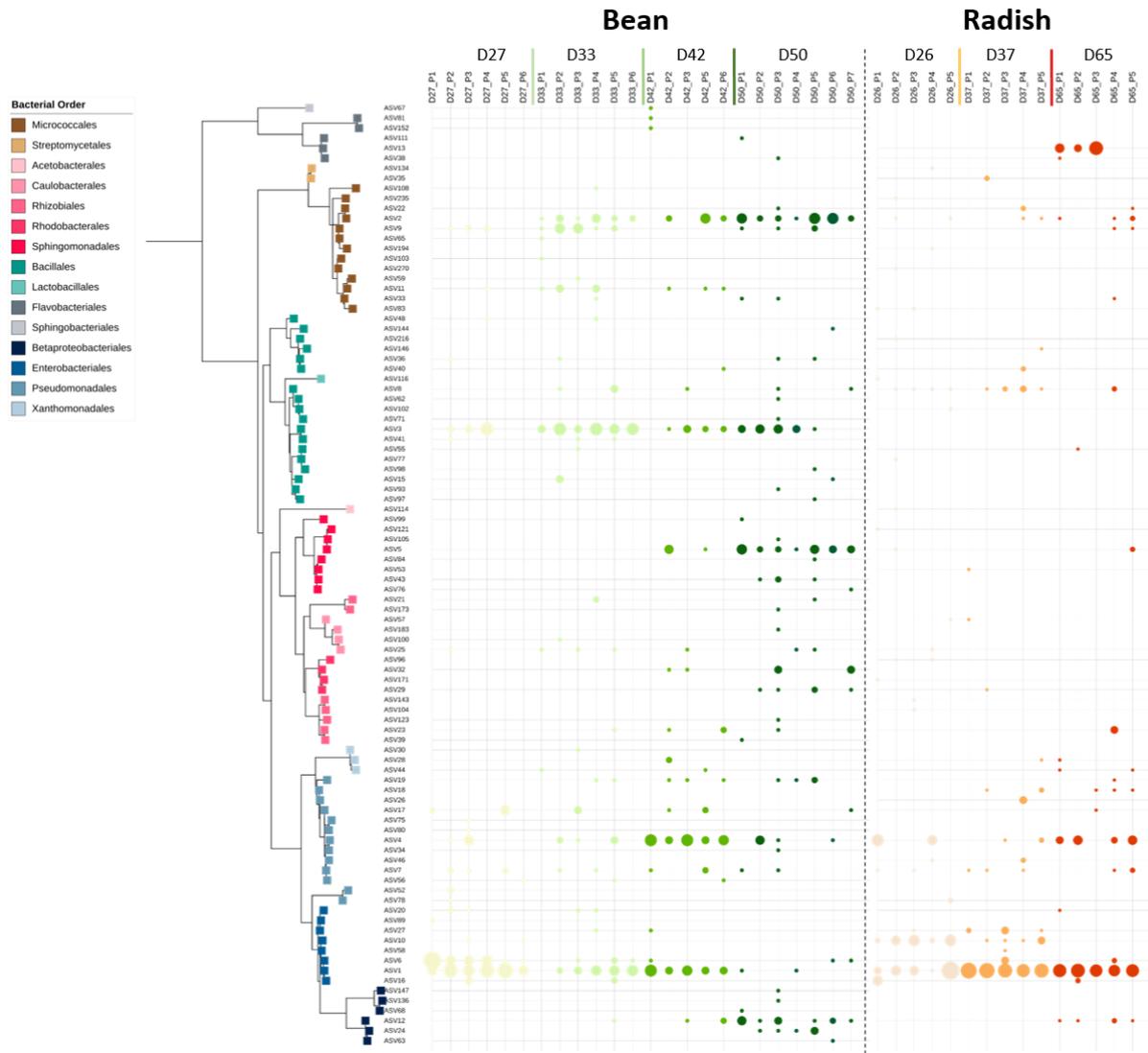
**Figure S3: Phylogenetic diversity of seed bacterial communities after culture-enrichment on different synthetic media.** Bacterial suspensions derived from radish seeds after soaking in PBS Tween (three subsamples of 1,000 seeds each) were diluted and plated on the following nine culture media: bacterial screening medium 523 (BSM); casein peptone soybean flour peptone agar (CASO); nutrient broth agar (NB); Reasoner's 2A (R2A); r3 medium (R3M) (Dione *et al.*, 2016) ; tryptic soy agar 1/10 strength (TSA10); tryptic soy agar (TSA100); tryptone yeast extract glucose (TYG) and yeast extract mannitol agar (YEM). Phylogenetic diversity (Faith's PD) of bacterial communities was estimated with the v4 region of 16S rRNA gene (**A**) and *gyrB* (**B**). Black circles represented the average phylogenetic diversity of three replicates, which are displayed in grey.





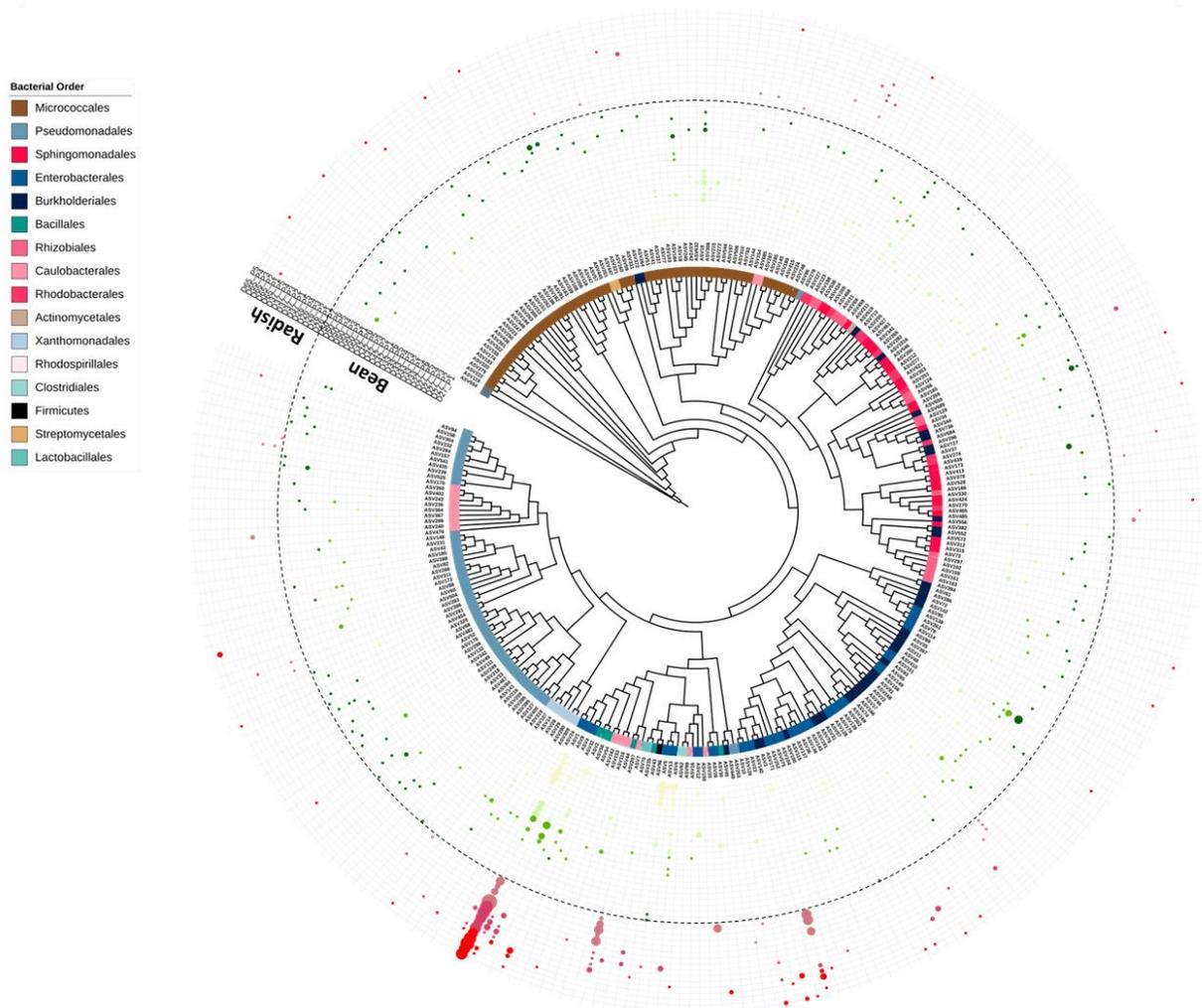
**Figure S4: Dominant bacterial taxa within the seed microbiota based on *gyrB*.** **A.** Rank abundance curves of bacterial ASVs associated with individual seeds. **B.** Faith’s phylogenetic diversity of rank1 ASV agglomerated at the plant level. **C.** Relative abundance of bacterial Orders calculated from rank 1 ASV agglomerated at the plant level. The names in each frame correspond to the stages sampled during seed development. The letters (a, b, c) indicated the significance level ( $P < 0.01$ ).





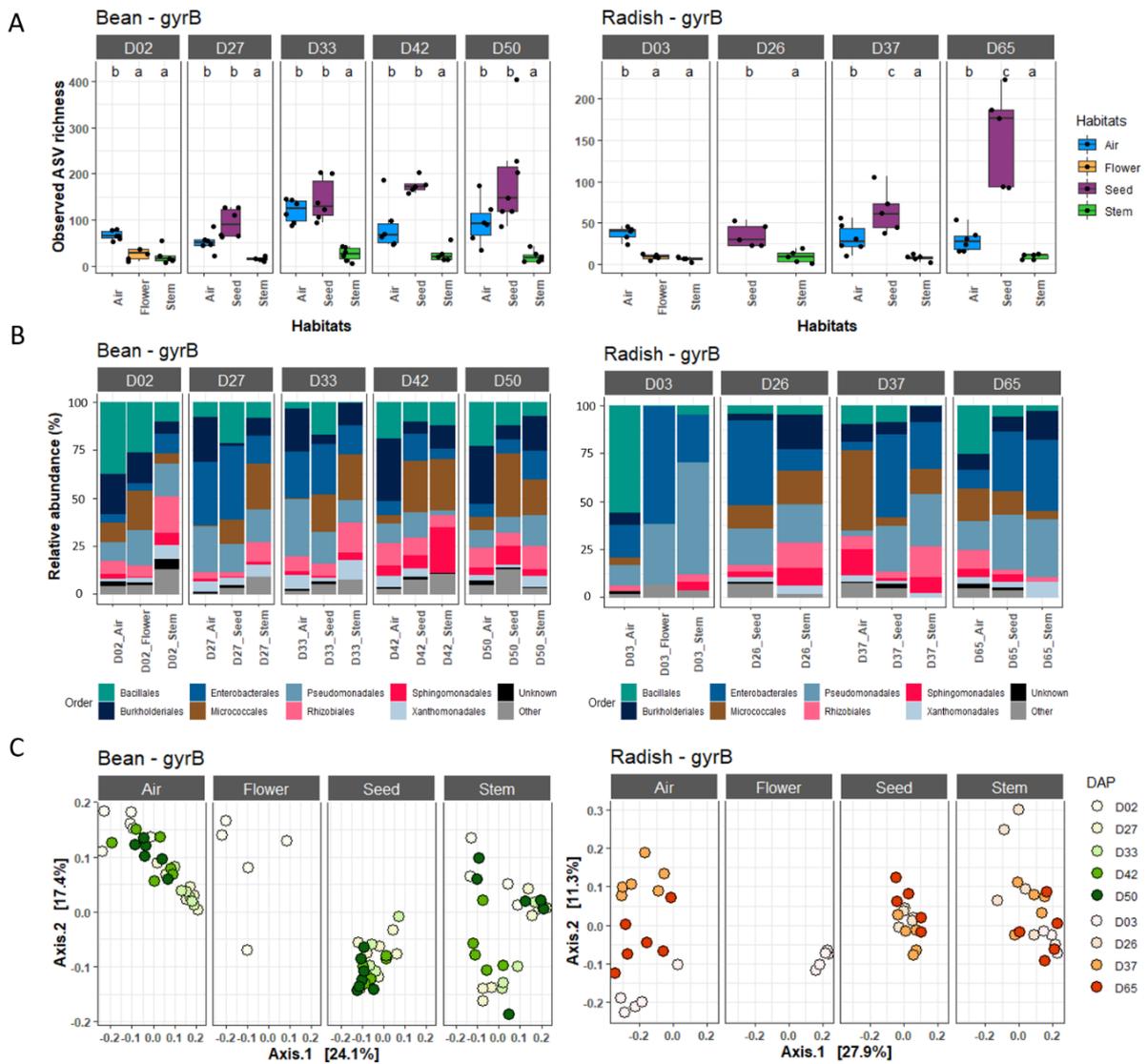
**Figure S5: Phylogenetic diversity of seed-borne dominant taxa based on 16S.** Neighbor-joining phylogenetic tree of dominant 16S ASV. Occurrence of seed-borne ASVs within a specific plant is represented by a circle whose size is proportional to its relative frequency. Tips labels represented taxonomy at the Order level.





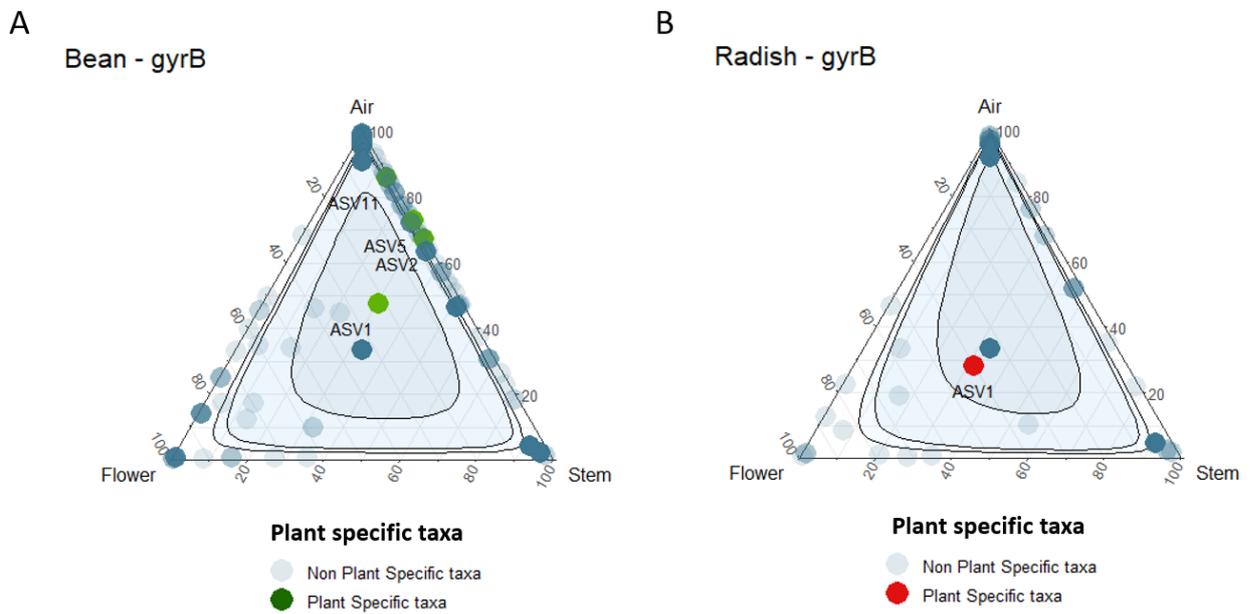
**Figure S6: Phylogenetic diversity of seed-borne dominant taxa based on *gyrB*.** Neighbor-joining phylogenetic tree of dominant *gyrB* ASV. Occurrence of seed-borne ASVs within a specific plant is represented by a circle whose size is proportional to its relative frequency. Tips labels represented taxonomy at the Order level.





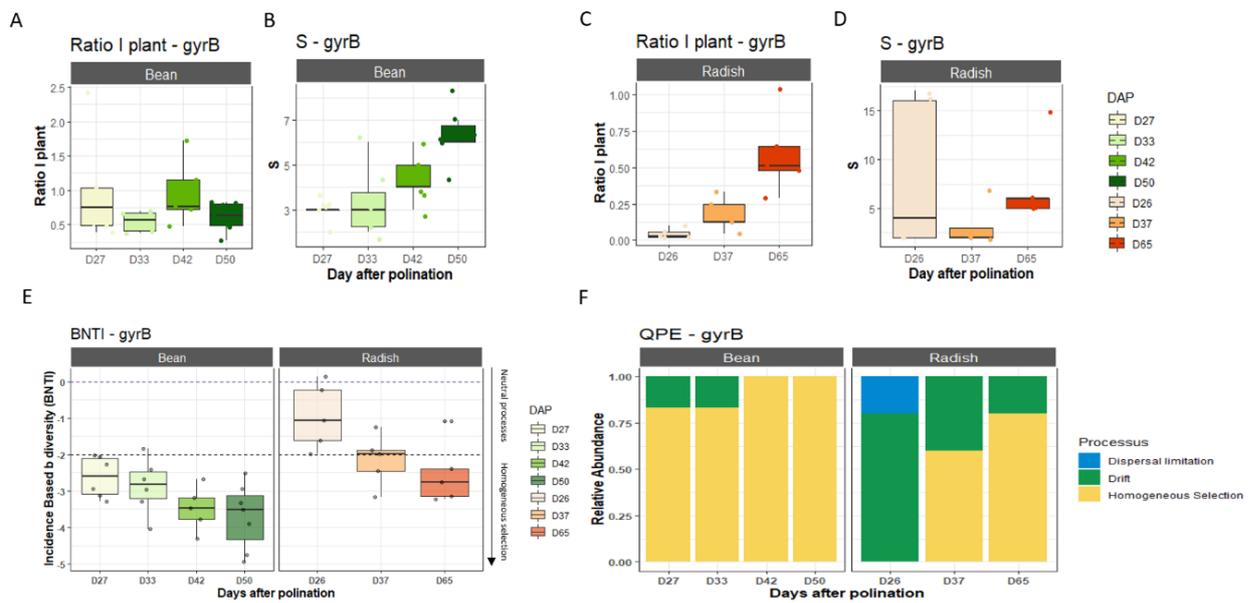
**Figure S7: Structure of microbiota associated with flowers, stems and atmosphere. A.** Observed richness for each habitat. The letters (a, b, c) indicated the significance level ( $P < 0.01$ ). **B.** Relative abundance of bacterial Orders for each habitat. **C.** Variation in bacterial phylogenetic composition as assessed with weighted UniFrac distances.





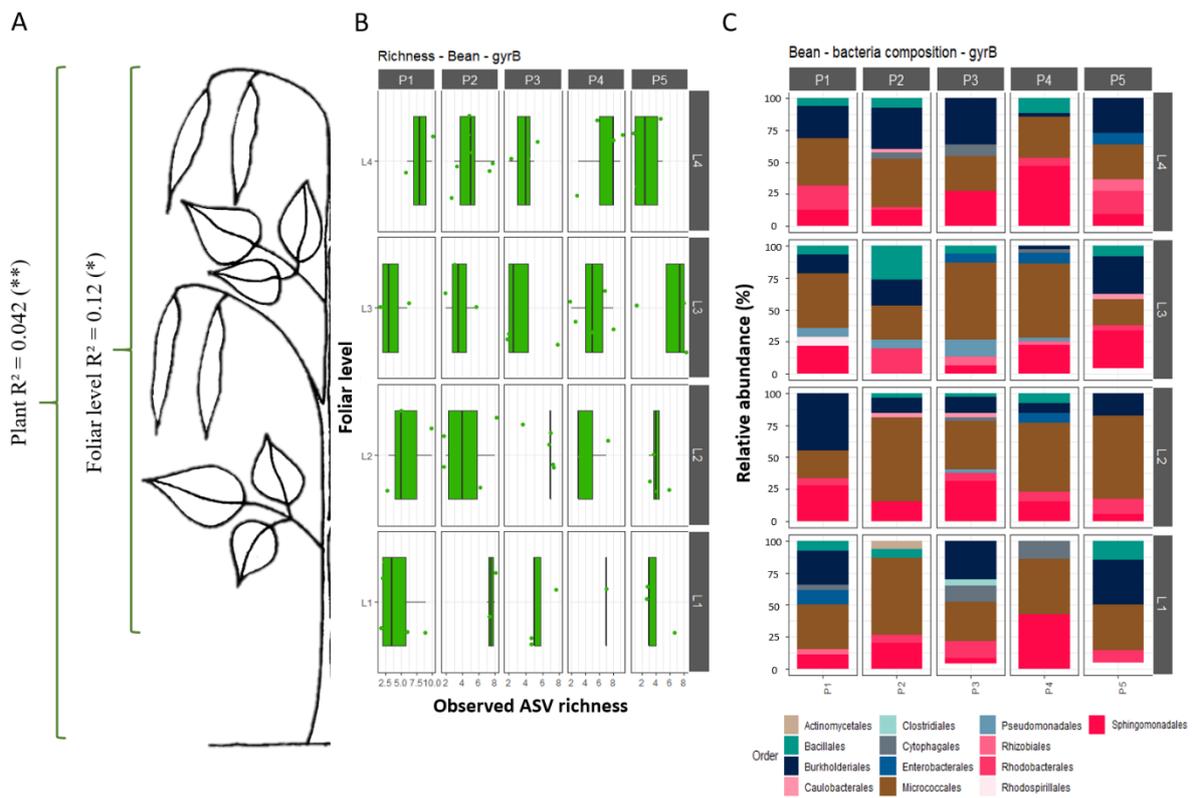
**Figure S8: Origin of dominant seed-borne taxa. A and B.** Detection of dominant seed-borne ASVs (*gyrB*) in other sampled habitats: flowers, stems and atmosphere. Intervals of confidence are indicated by a blue color gradient ranging from 0.50 to 0.95. ASVs significantly associated with a specific plant (see **Table S1**) are highlighted in green (**A**) and red (**B**) for bean and radish. Of note, ASV20 is not represented for radish because it was not detected in any sampled habitats.





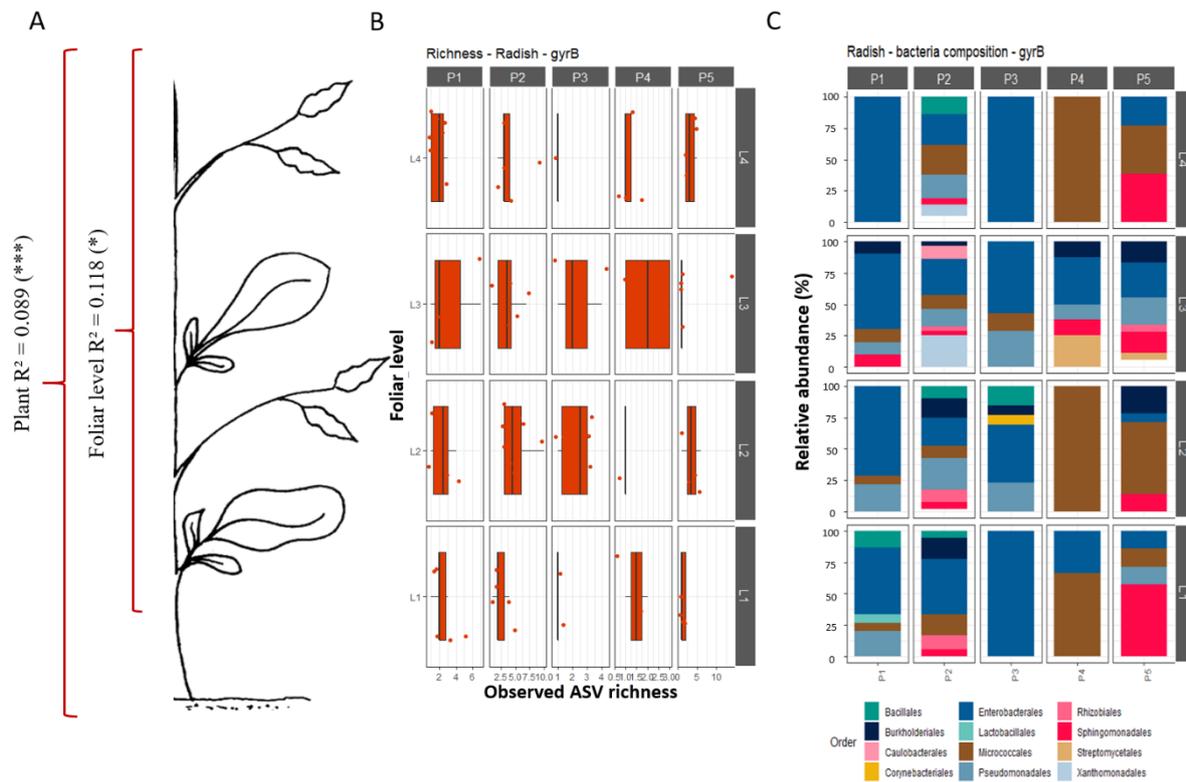
**Figure S9: Ecological processes involved in seed microbiota assembly.** **A-C.** The ratio  $I$  is used to estimate the relative importance of dispersal over seed internal processes (see Methods). **B-D.** Distribution of  $S$  (richness) as a function of the sampling day. **E.**  $\beta$ -nearest taxon index ( $\beta$ NTI) calculated to assess deviation from the null expectation. **F.** Relative importance of species-sorting (homogeneous selection), dispersal limitation or ecological drift in assembly of seed bacterial communities at the plant level. Analyses were performed with *gyrB* (**D**). **A-B-C-D** were calculated at the individual seed level, while **E-F** from plant level.





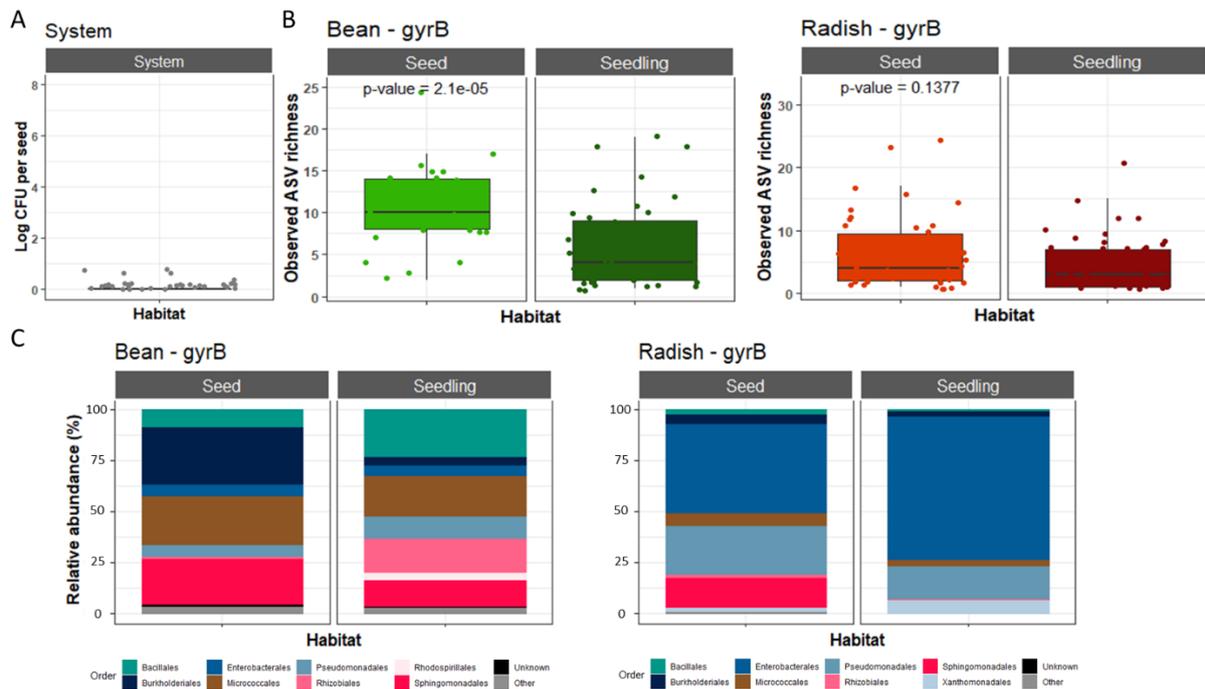
**Figure S10: Influence of foliar level on the structure of bean seed microbiota. A.** Variation in seed bacterial phylogenetic composition (weighted Unifrac distance) according to individual plants and foliar level inside each plant (PERMANOVA; \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.01$ ). **B.** Average richness of seed microbiota per foliar level inside each plant. **C.** Relative abundance of bacterial Orders per foliar level. Foliar levels are represented as a gradient from the bottom of the plant (L1) to the top of the plant (L4), y-axis. All analyses were performed with *gyrB*.





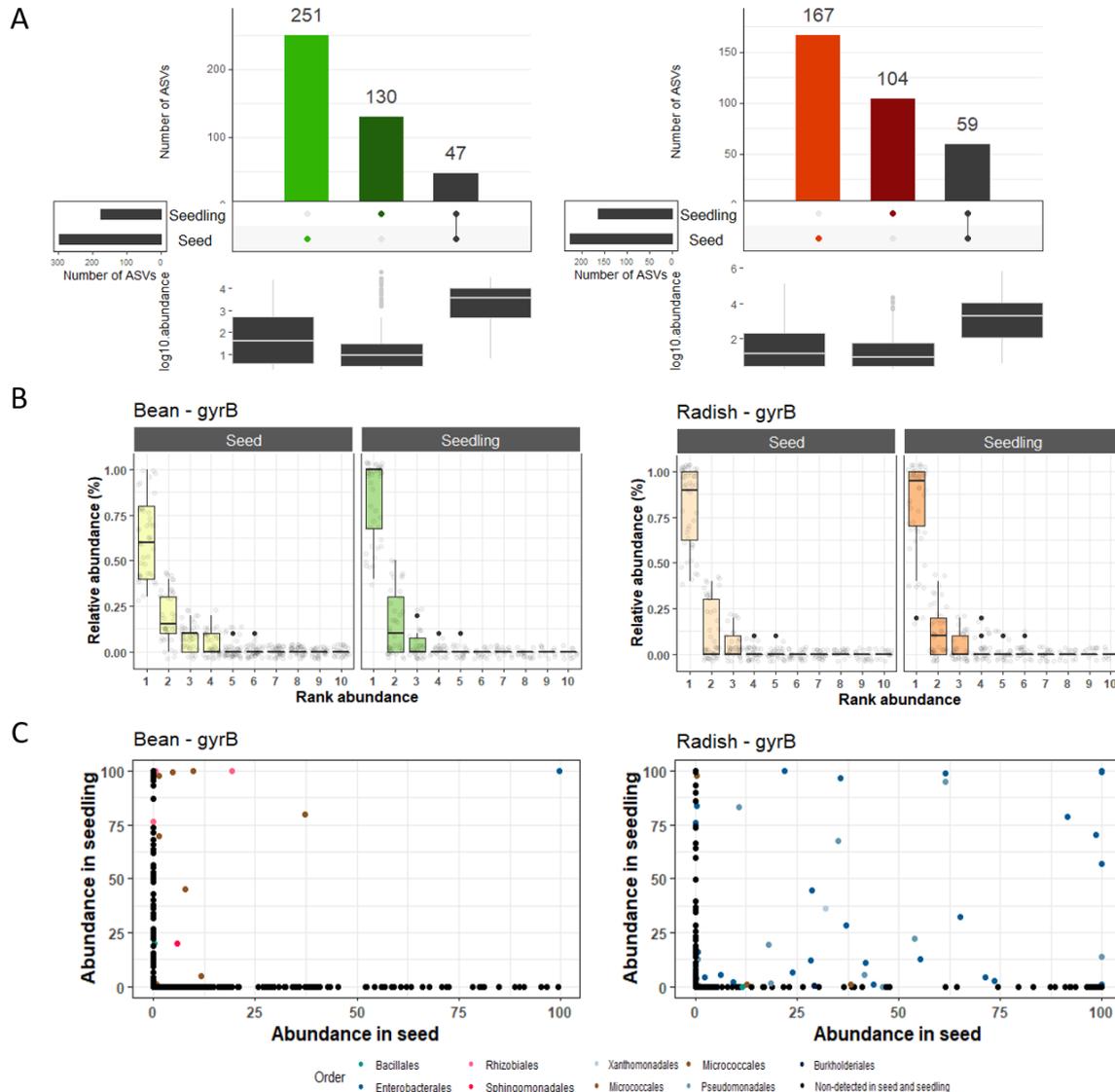
**Figure S11: Influence of foliar level on the structure of radish seed microbiota. A.** Variation in seed bacterial phylogenetic composition (weighted Unifrac distance) according to individual plants and foliar level inside each plant (PERMANOVA; \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.01$ ). **B.** Average richness of seed microbiota per foliar level inside each plant. **C.** Relative abundance of bacterial Orders per foliar level. Foliar levels are represented as a gradient from the bottom of the plant (L1) to the top of the plant (L4), y-axis. All analyses were performed with *gyrB*.





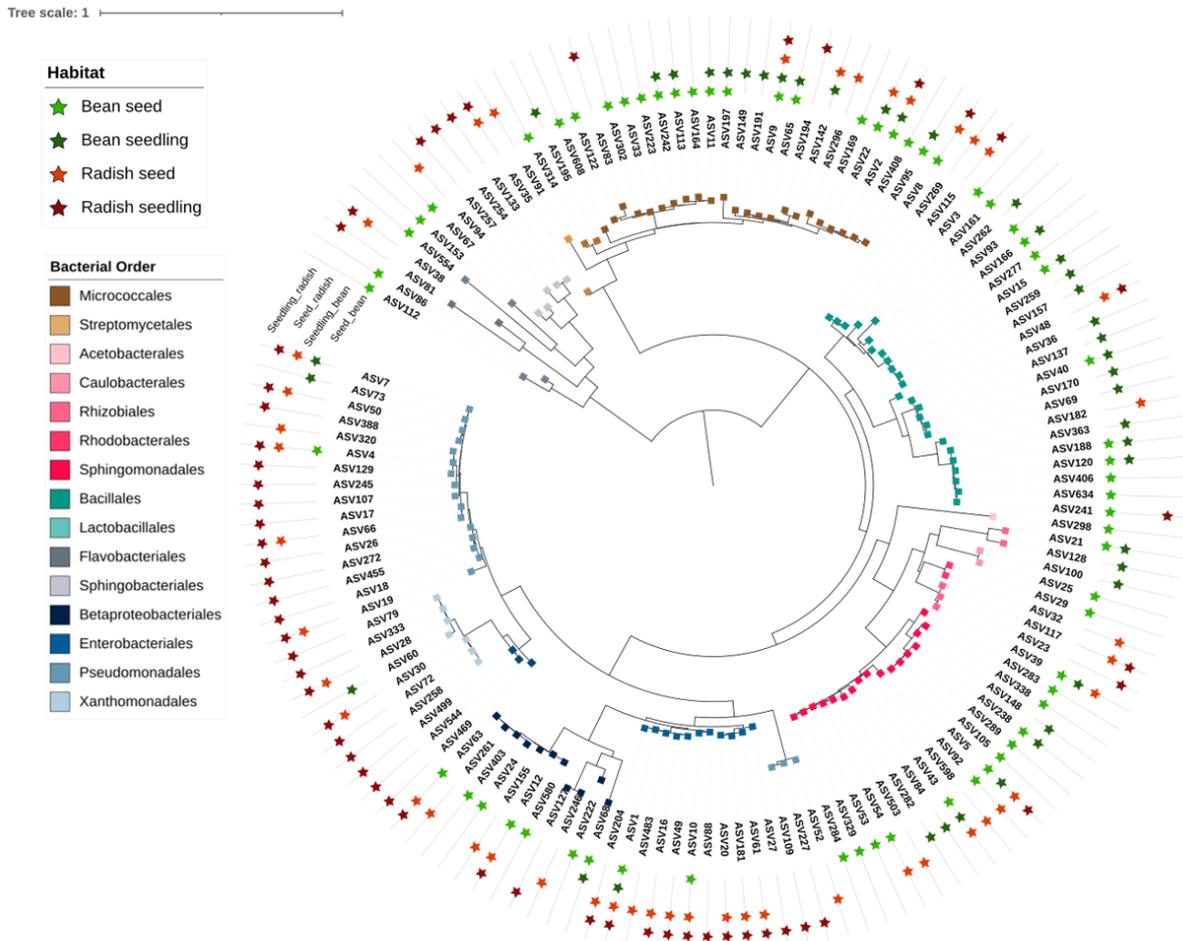
**Figure S12: Comparison of seed and seedling microbiota profiles. A.** Log<sub>10</sub> CFU detected after seven days in our experimental system composed of tubes filled with cotton and sterile water. **B.** Average richness (estimated with *gyrB* ASVs) in seed and seedling. **C.** Taxonomic profile (Order level - *gyrB*) of seeds and seedlings microbiota. *P*-values were derived from a Wilcoxon rank sum test.





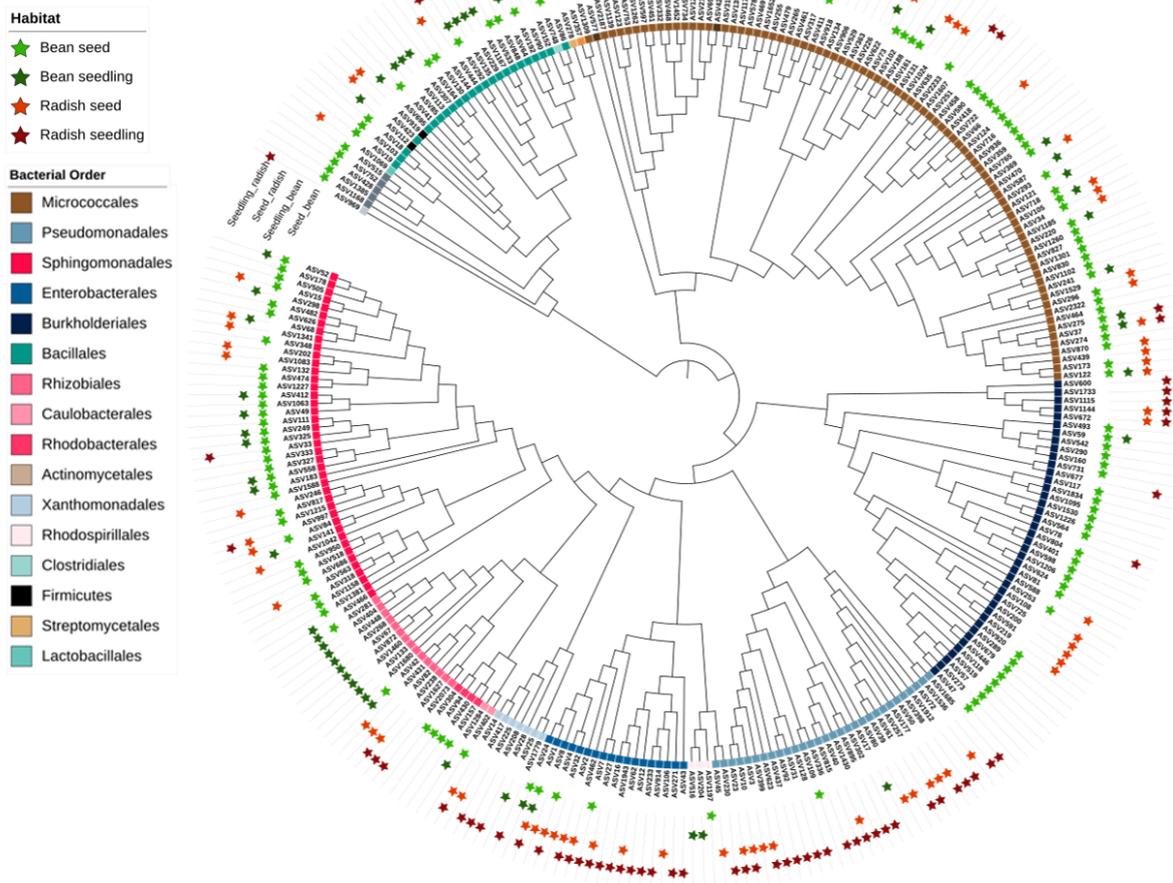
**Figure S13: Seed to seedling transmission. A.** Number of *gyrB* ASVs specifically detected on seeds (light color), seedlings (dark color) or both habitats (black). **B.** Rank abundance curves of *gyrB* ASVs in individual seeds and seedlings. **C.** Comparison of *gyrB* ASV relative abundance in seed and seedling. Each dot corresponded to one ASV, which is colored according to its taxonomic affiliation at the Order level.





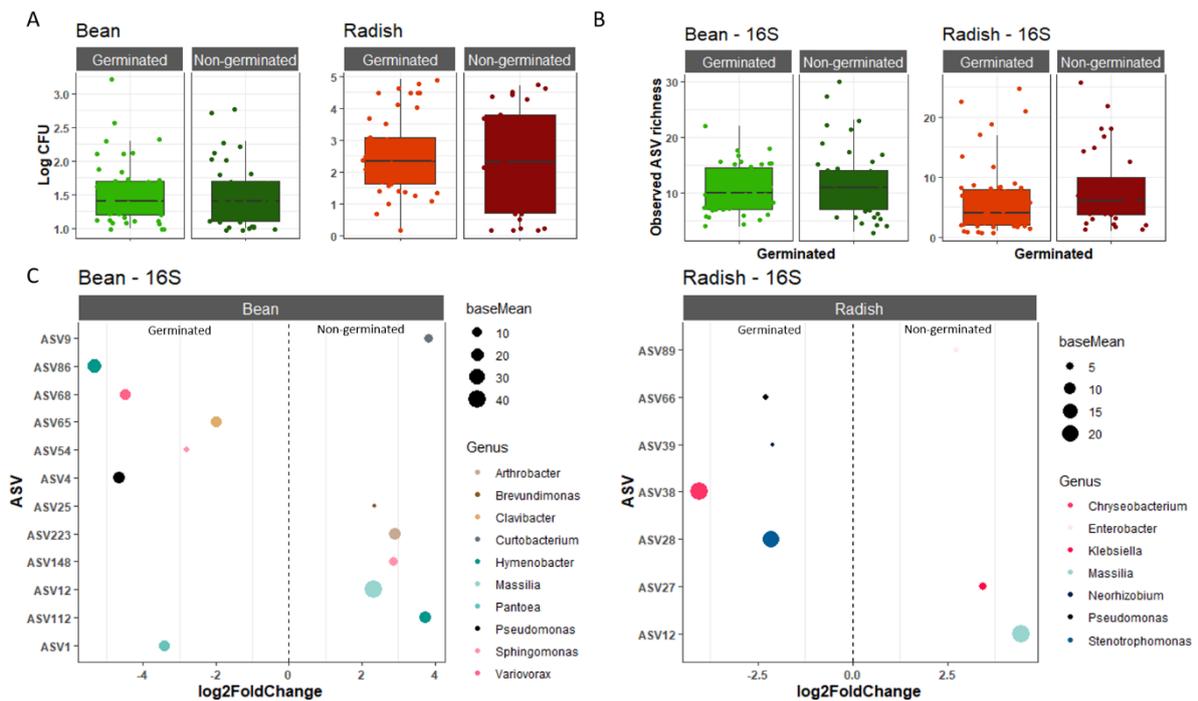
**Figure S14: Phylogenetic diversity of 16S ASVs associated with seeds and seedlings.** Neighbor-joining phylogenetic tree of bacterial ASVs. Stars represent ASV present in bean seed (light green), bean seedling (dark green), radish seed (light red) or radish seedling (dark red). Colors represent taxonomy at the Order level.





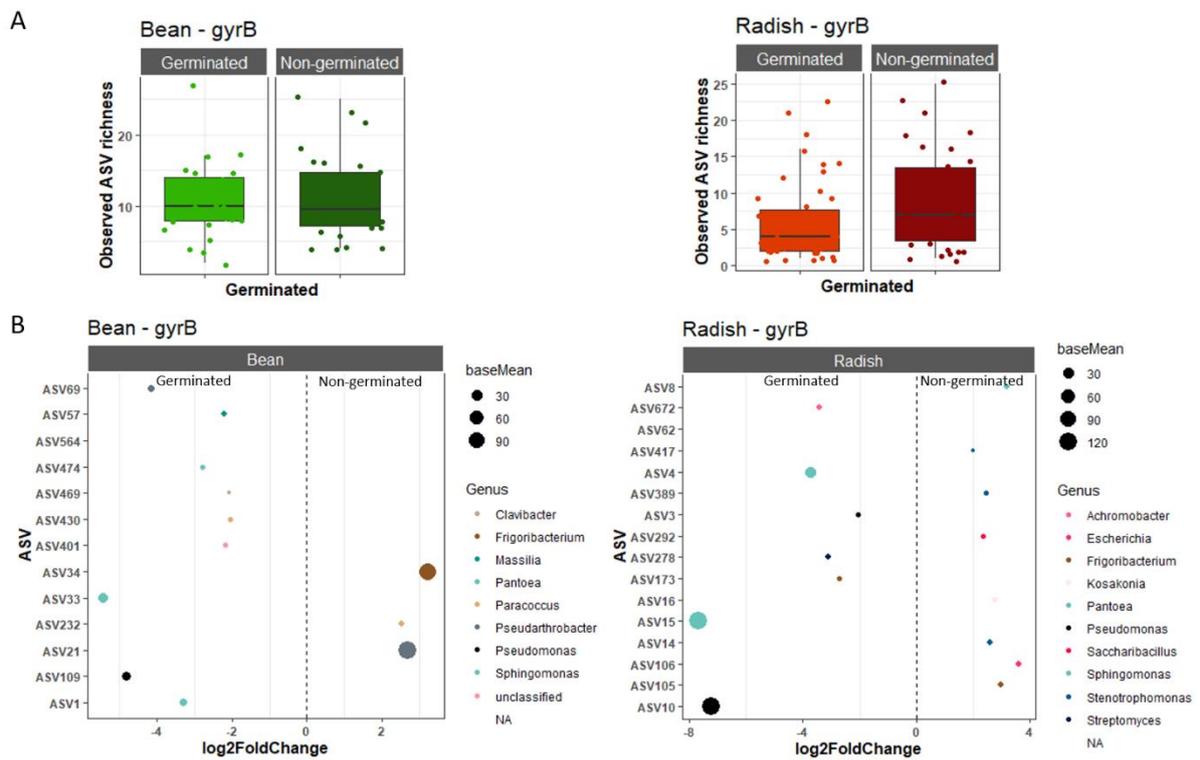
**Figure S15: Phylogenetic diversity of *gyrB* ASVs associated with seeds and seedlings.** Neighbor-joining phylogenetic tree of bacterial ASVs. Stars represent ASV present in bean seed (light green), bean seedling (dark green), radish seed (light red) or radish seedling (dark red). Colors represent taxonomy at the Order level.





**Figure S16: Differences in seed microbiota profile (16S) between germinated and non-germinated seeds.** **A.** Correspondence between initial bacterial population size (log<sub>10</sub> CFU) and seed germination. **B.** Average richness in germinated and non-germinated seeds. **C.** ASVs significantly ( $P < 0.01$ ) enriched in germinated seeds (left) or non-germinated seeds (right). ASVs are colored according to their taxonomic affiliations at the genus level.





**Figure S17: Differences in seed microbiota profile (*gyrB*) between germinated and non-germinated seeds. A. Average richness in germinated and non-germinated seeds. B. ASVs significantly ( $P < 0.01$ ) enriched in germinated seeds (left) or non-germinated seeds (right). ASVs are colored according to their taxonomic affiliations at the genus level.**



**Table S1 : Taxonomy, prevalence and frequency associated with dominant ASVs estimated with *gyrB* primer, for bean.**

ASV	Prevalence	Frequency	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
ASV1	60	0,115	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV5	34	0,073	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV6	21	0,049	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV4	19	0,046	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV19	18	0,046	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	unclassified	Exiguobacterium	Exiguobacterium_antarcticum
ASV2	17	0,046	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV11	13	0,037	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_putida
ASV18	10	0,029	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	unclassified	Exiguobacterium	Exiguobacterium_sibiricum
ASV21	9	0,027	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Pseudarthrobacter	Pseudarthrobacter_unclassified
ASV13	6	0,019	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV12	6	0,019	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Kosakonia	Kosakonia_unclassified
ASV44	5	0,016	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Erwinia	Erwinia_gerundensis
ASV66	5	0,016	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Frigoribacterium	Frigoribacterium_unclassified
ASV34	5	0,017	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Frigoribacterium	Frigoribacterium_unclassified
ASV16	4	0,014	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Kosakonia	NA
ASV3	4	0,014	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_viridiflava
ASV30	4	0,014	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_unclassified
ASV77	4	0,014	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	unclassified	Exiguobacterium	NA
ASV48	4	0,014	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_putida
ASV124	4	0,014	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Frigoribacterium	Frigoribacterium_unclassified
ASV47	4	0,015	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	Massilia_unclassified
ASV10	3	0,011	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_viridiflava
ASV36	3	0,011	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_moraviensis
ASV46	3	0,011	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_montellii
ASV102	3	0,012	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Microbacterium	Microbacterium_paraoxydans
ASV341	3	0,012	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Curtobacterium	Curtobacterium_unclassified
ASV123	3	0,012	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Arthrobacter	Arthrobacter_unclassified
ASV60	3	0,012	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Agrobacterium	Agrobacterium_tumefaciens_comple
ASV22	3	0,012	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV49	3	0,012	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	Sphingomonas_unclassified
ASV14	3	0,012	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	Stenotrophomonas_unclassified
ASV33	3	0,013	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	Sphingomonas_unclassified
ASV173	3	0,013	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Frigoribacterium	Frigoribacterium_unclassified
ASV52	3	0,013	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	Sphingomonas_unclassified
ASV170	3	0,013	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	NA	NA
ASV54	2	0,009	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV184	2	0,009	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	unclassified	Exiguobacterium	Exiguobacterium_sibiricum



**Table S2 : Taxonomy, prevalence and frequency associated with dominant ASVs estimated with *gyrB* primer, for radish.**

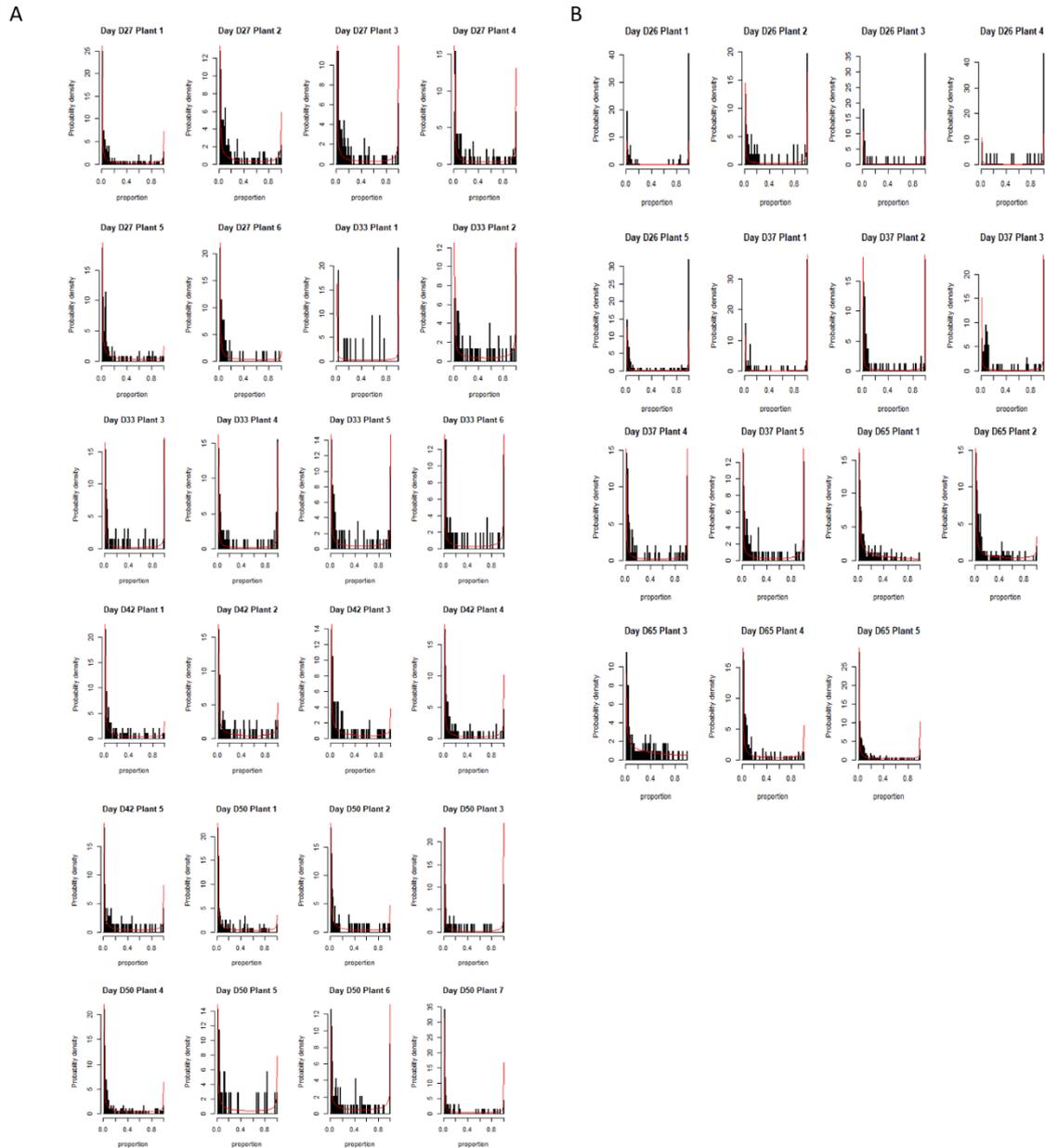
ASV	Prevalence	Frequency	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
ASV1	229	0,530	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV7	33	0,163	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Yersiniaceae	Serratia	Serratia_marcescens
ASV3	27	0,159	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_viridiflava
ASV8	12	0,084	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV4	10	0,076	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV20	7	0,058	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_ananatis
ASV2	7	0,061	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV23	5	0,047	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_viridiflava
ASV86	4	0,039	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_thuringiensis
ASV43	4	0,041	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Erwinia	Erwinia_pescicina
ASV24	4	0,043	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_agglomerans
ASV10	4	0,044	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_viridiflava
ASV6	3	0,035	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	NA	NA
ASV31	3	0,036	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_marginalis
ASV88	3	0,038	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	NA	NA
ASV17	2	0,026	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_fulva
ASV239	2	0,027	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	Paracoccus_unclassified
ASV14	2	0,027	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	Stenotrophomonas_unclassified
ASV283	2	0,028	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Aurantimonadaceae	Aureimonas	Aureimonas_altamirensis
ASV485	2	0,029	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Microbacterium	Microbacterium_oxydans
ASV240	2	0,030	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	Brevundimonas_diminuta
ASV70	2	0,031	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	unclassified	bacteria_symbiont_BFo1_of_Fr
ASV359	2	0,032	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Frigoribacterium	Frigoribacterium_unclassified
ASV74	2	0,033	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_mosselii
ASV41	2	0,034	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	Paenibacillus_amyolyticus
ASV76	2	0,035	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_fluorescens
ASV26	2	0,036	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Erwiniaceae	Pantoea	Pantoea_ananatis
ASV400	1	0,019	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	Sphingomonas_unclassified
ASV435	1	0,019	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	Paracoccus_yeei
ASV685	1	0,020	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	Lactococcus_lactis
ASV203	1	0,020	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	unclassified	Enhydrobacter	Enhydrobacter_unclassified
ASV783	1	0,020	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	NA	NA
ASV506	1	0,021	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillus_tequilensis
ASV59	1	0,021	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax	Variovorax_unclassified
ASV445	1	0,022	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	unclassified	unclassified_unclassified
ASV396	1	0,022	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Aurantimonadaceae	Aureimonas	Aureimonas_altamirensis
ASV379	1	0,023	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	Microbacterium	Microbacterium_unclassified



**Table S3 : ASVs significantly associated with one individual plant at each stage of development.**

Plant species	Plant	16S rRNA gene					gyrB				
		ASV	Taxonomy	Frequency	Residual	Stem (RA%)	ASV	Taxonomy	Frequency	Residual	Stem (RA%)
Bean	D27_P1	ASV6	Erwiniaceae	0,73	4,95	24,52	ASV5	Erwiniaceae	0,47	3,27	58,23
Bean	D27_P2	-	-	-	-	-	ASV2	<i>P. agglomerans</i>	0,20	3,13	nd
Bean	D27_P5	-	-	-	-	-	ASV1	<i>P. agglomerans</i>	0,64	3,57	45,18
Bean	D33_P6	-	-	-	-	-	ASV1	<i>P. agglomerans</i>	0,44	3,82	20,09
Bean	D50_P2	ASV4	<i>Pseudomonas</i>	0,35	4,12	nd	ASV11	<i>P. putida</i>	0,44	7,02	nd
Radish	D26_P1	ASV4	<i>Pseudomonas</i>	0,38	3,87	8,98	-	-	-	-	-
Radish	D26_P1	ASV16	Erwiniaceae	0,24	4,70	nd	ASV20	<i>P. ananatis</i>	0,25	4,66	nd
Radish	D26_P4	ASV4	<i>Pseudomonas</i>	0,44	3,53	99,97	-	-	-	-	-
Radish	D26_P5	ASV1	<i>Pantoea</i>	0,71	3,67	nd	ASV1	<i>P. agglomerans</i>	0,77	3,73	nd
Radish	D65_P3	ASV13	<i>Chryseobacterium</i>	0,53	4,70	NA	-	-	-	-	-





**Figure Ss1: The empirical and estimated probability densities of proportions.** Probabilities were estimated for each day and each plant of bean (A) and radish (B).



### III. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence qu'une graine était composée (i) d'un taxon très abondant dont l'affiliation taxonomique était très variable entre les graines et (ii) d'une cohorte peu abondante de micro-organismes. La graine semblerait donc être permissive à une large gamme de micro-organismes. Selon les modèles neutres, la sélection est le principal moteur de l'assemblage des communautés microbiennes pour les deux espèces végétales à chaque stade de développement. Nous émettons l'hypothèse que cette sélection pourrait être associée aux défenses des plantes, à la quantité et la qualité des composés nutritifs présents dans la graine à un stade donné ou encore à la diminution de la teneur en eau dans les graines. Cette sélection induit des dynamiques d'assemblage variables selon les espèces de plantes étudiées. Chez le radis, les taxons pionniers semblent persister pendant le développement de la graine. Au contraire, chez le haricot un fort remplacement des taxons se réalise au cours du développement des graines. De manière intéressante dans le précédent chapitre, nous avons remarqué des résultats contradictoires avec un très faible remplacement des taxons bactériens au cours du développement de la graine de haricot avec un taxon majoritaire affilié à *Pseudomonas orientalis* retrouvé tout au long du développement de la graine. Cette différence met à jour l'importance de la parcelle comme inoculum bactérien pour les graines.

Même s'il a été compliqué d'identifier les voies de colonisation préférentielles du microbiote des graines du fait d'un sous-échantillonnage des sources potentielles en micro-organismes (fleurs, atmosphère et tissus vasculaires), nous avons pu observer que la voie florale n'était que très peu utilisée par les bactéries colonisant les graines de haricot en comparaison au radis. Ce résultat confirme les résultats du précédent chapitre.

L'abondance d'une bactérie sur la graine ne garantit pas sa transmission à la plantule. Ces résultats concordent avec des études récemment publiées démontrant que les taxons rares associés aux graines étaient plus efficacement transmis aux plantules (Rochefort *et al.* 2020). Ces résultats mettent à jour l'importance de la sélection du microbiote pendant l'émergence des plantules. Ainsi, manipuler le microbiote peut être rendu possible par la sélection de taxons bénéfiques pour la plante et par conséquent, la contre sélection de taxons néfastes pour la plante. Nous avons pu identifier un ASV affilié à l'espèce *Pantoea agglomerans* qui induisait significativement des symptômes de pourriture racinaire lorsqu'il était présent sur la graine. De plus, cet ASV a été largement détecté sur un grand nombre de semences, d'origine géographique



et d'espèces de plantes diverses (Simonin *et al.* 2021), il semblerait qu'il possède de grandes aptitudes à coloniser la graine et à se transmettre à la plantule.

Les résultats de ce chapitre présentent une description approfondie de l'assemblage du microbiote des graines, des origines du microbiote des graines, de leur transmission à la plantule et de leur impact sur le phénotype de la plante, à travers une seule et unique culture expérimentale réalisée en condition agronomique. Elle permet de compléter les résultats obtenus dans le premier chapitre de cette thèse et d'approfondir les connaissances autour de l'assemblage du microbiote des graines. Les perspectives globales de ses travaux seront de confirmer les dynamiques observées par l'inoculation de taxon ou de communautés synthétiques sur plante mère ou sur graines. Enfin, l'un des principaux enjeux portera sur l'étude des déterminants et des mécanismes moléculaires impliqués dans l'assemblage du microbiote des graines et de sa transmission aux plantules.



# CHAPITRE 3

*Analyse des déterminants bactériens et des défenses des plantes impliqués dans la colonisation de la plantule*



## I. Introduction

### a. Contexte

La transmission des micro-organismes de la graine à la plantule représente la première étape de l'assemblage du microbiote de la plante et peut impacter le phénotype de l'hôte (Puenta, Li and Bashan 2009; Matsumoto *et al.* 2021). A ce jour, cette transmission a été principalement étudiée à travers des analyses de profils de communautés microbiennes (Green *et al.* 2006; Ofek, Hadar and Minz 2011; Yang *et al.* 2017). Cependant, le dialogue moléculaire qui s'établit entre le microbiote et son hôte lors des phases hétérotrophes de croissance de la plante, reste à ce jour largement méconnu. A ma connaissance, une seule étude a analysé la réponse immunitaire de la plante lors de la germination et la levée suite à l'inoculation par un agent phytopathogène (Darrasse *et al.* 2010). Les auteurs de ce travail ont montré que l'inoculation de la bactérie *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* sur graine de haricot n'induisait pas les voies de défense de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène chez les graines germées et les plantules.

Si les voies de défense de la plante ne semblent pas être impliquées dans la dynamique du microbiote des graines lors des phases précoces de développement de son hôte, les métabolites primaires et secondaires relargués lors de la germination sont en revanche potentiellement impliqués dans cette succession. En effet, pendant l'imbibition des graines, de nombreux composés vont être exsudés par la graine en germination dans le sol. On retrouve notamment des sucres, des acides gras, des acides organiques ou encore des acides aminés (Nelson 2004). Ces composés vont augmenter la disponibilité en nutriments dans le sol et modifier la composition des communautés microbiennes de la spermosphère. En effet, il a été démontré que les organismes microbiens copiotrophes avaient un avantage compétitif dans la colonisation des plantes pendant la germination et l'émergence (Barret *et al.* 2015; Yang *et al.* 2017; Torres-Cortés *et al.* 2018). Par ailleurs les micro-organismes vont également devoir résister à de nombreux métabolites secondaires relargués par la plante (Scarafoni *et al.* 2013). A l'exception de quelques gènes impliqués dans le métabolisme énergétique comme *pfkA* (Roberts *et al.* 1999a) ou *rpiA* (Lohrke *et al.* 2002) d'*Enterobacter cloacae*, peu de données bibliographiques sont disponibles sur les déterminants génétiques bactériens nécessaires à la colonisation des graines germées et des plantules.



### b. Objectifs et stratégies

Ce chapitre a pour objectif d'étudier le dialogue moléculaire s'établissant entre la plante et son microbiote lors des phases hétérotrophes de croissance de la plante. Plus spécifiquement nous nous sommes focalisés sur **l'étude *a priori* de l'expression des voies de défenses de la plante** médiées par l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène. Pour cela, nous avons mesuré l'activation de l'expression de plusieurs gènes de ces voies de défenses au sein des plantules de radis. Cette mesure d'expression a été réalisée sur des plantules issues de graines (i) désinfectées en surface (avec un microbiote réduit), (ii) non-désinfectées (possédant un microbiote naturel) ou (iii) désinfectées en surface puis inoculées avec des souches bactériennes représentatives des taxons bactériens abondants au sein du microbiote des graines.

Dans un second temps nous avons cherché à **connaître les déterminants génétiques bactériens nécessaires à la colonisation de la plantule**. Pour répondre à cette question, nous avons inoculé des graines désinfectées de radis avec une banque de mutants (RB-TnSeq) de la souche *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc8004). Nous avons ensuite comparé l'abondance des mutants dans notre inoculum initial à celle retrouvée au sein des plantules. Ces déterminants moléculaires ont été analysés en absence ou en présence d'autres membres bactériens du microbiote des graines afin de distinguer l'interaction bipartite radis-Xcc8004 des interactions inter-bactériennes.

### c. Contribution des auteurs à ce travail

Dans ces travaux, j'ai analysé les données, réalisé la production des figures et la rédaction de ce chapitre, conjointement avec Matthieu BARRET. J'ai réalisé l'ensemble des expériences avec Amandine LE RUYET (stagiaire Master 1 que j'ai encadré sur la période d'avril à juillet 2021). Les échantillonnages des plantules ont été réalisés avec l'aide de plusieurs membres de l'équipe EmerSys (Anne PREVEAUX, Sophie BONNEAU et Coralie MARAIS). J'ai dessiné les amorces qPCR et réalisé les analyses d'expression des gènes de défense avec l'aide de Brice MAROLLEAU et Anthony JUILLARD (équipe RESPOM, IRHS). La banque RB-TnSeq Xcc8004 nous a été fournie par Alice BOULANGER (LIPME, Toulouse). J'ai réalisé les analyses des données RB-TnSeq conjointement avec Lauren LUI (Lawrence Berkeley Lab, CA, USA). Tous les séquençages ont été réalisés avec l'aide de Muriel BAHUT et Coralie MARAIS du plateau ANAN (SFR QUASAV) ainsi que de Benjamin NAVET (CHU, Angers). Daniel SOCHARD (INEM, IRHS) s'est occupé du suivi des cultures, tout au long des expérimentations. L'ensemble des auteurs ont participé à l'édition et à la révision de ce chapitre.



## II. Résultats

**Title: Molecular determinants involved in bacterial seedling transmission**

**Running title: Bacterial seedling transmission**

Guillaume Chesneau<sup>1</sup>, Lauren Lui<sup>2</sup>, Alice Boulanger<sup>3</sup>, Morgan Price<sup>2</sup>, Brice Marolleau<sup>1</sup>, Anne Préveaux<sup>1</sup>, Amandine Le Ruyet<sup>1</sup>, Adam Arkin<sup>2</sup>, Matthieu Barret<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

<sup>2</sup>Environmental Genomics and Systems Biology Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, United States of America.

<sup>3</sup>LIPME, université de Toulouse, INRAE, CNRS, université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, France



**Introduction :**

Seed microbiota is ecologically interesting in that it represents a starting point for the community assembly of the new seedling microbiota (Shade, Jacques and Barret 2017). Members of the seed microbiota are not necessarily transmitted to the seedlings. According to various studies, a decrease in microbial richness has been observed during germination and emergence of various plant species (Ofek, Hadar and Minz 2011; Barret *et al.* 2015; Yang *et al.* 2017; Rochefort *et al.* 2021). The persistence of members of the seed microbiota in the first plant developmental stages is strongly dependent on the ability to adapt to the changing environmental conditions occurring within the spermosphere. Indeed, this habitat is largely made up of carbon sources released by the seed into the surrounding bulk soil (Nelson 2004). The spermosphere is therefore an area of intense microbial activity with many interactions between micro-organisms (Nelson 2018). To date, the microbial genetic determinants necessary for the initial colonization of the spermosphere and the persistence in seedling are mostly unknown.

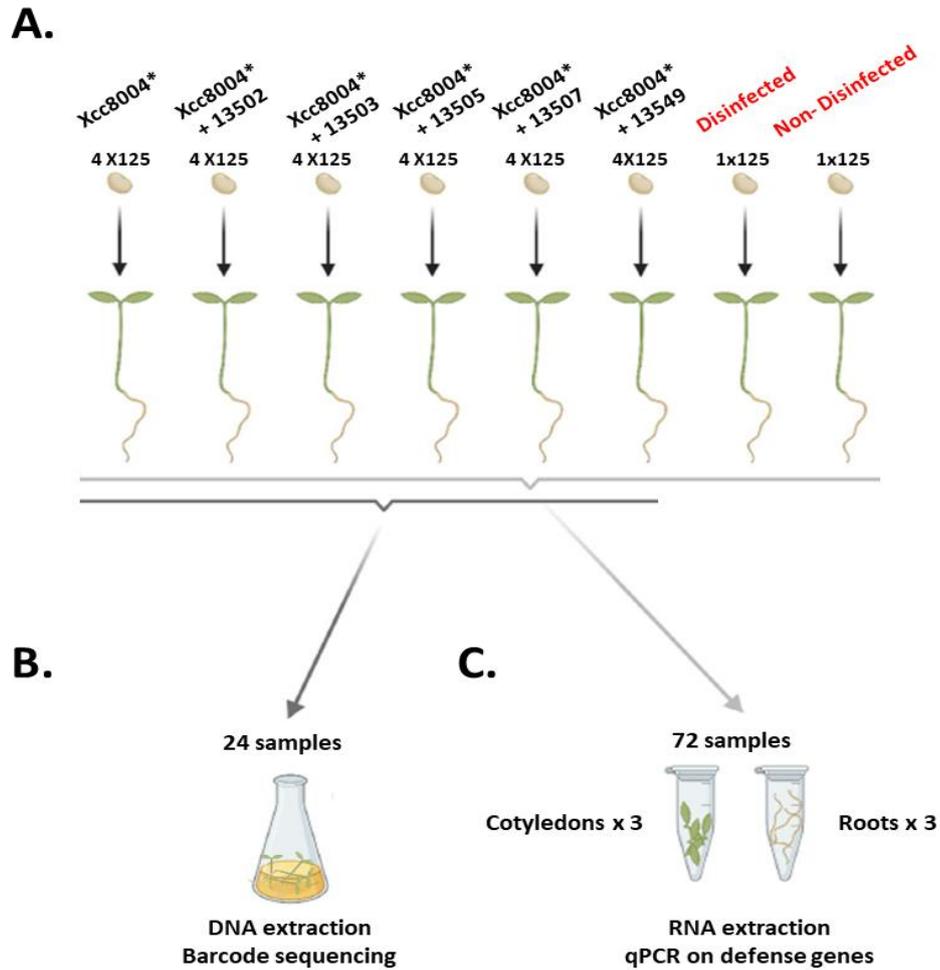
Since the nature and the temporal variation of seed exudates exert a major influence on microbial activity (Nelson, 2004), genes involved in carbohydrate catabolism such as *pfkA* (encoding a phosphofructokinase) and *rbiA* (encoding a ribose-5-phosphate isomerase) were reported as important for efficient spermosphere colonization of *Enterobacter cloacae* (Roberts *et al.* 1999a; Lohrke *et al.* 2002). In a more general way, a metagenomics survey performed on seed, germinated seeds and seedlings identify copiotrophy as an important trait for efficient seed to seedling transmission (Torres-Cortés 2018). Beyond the importance of plant primary metabolism in shaping the spermosphere habitat, other compounds related to volatile and antimicrobial compounds are also impacting spermosphere microbiota composition (Schiltz *et al.*, 2015). Whether these compounds are synthesized in a basal or induced way remained to be investigated. Indeed plant immunity have been mainly studied in vegetative tissue during the autotrophic phase of plant development (Hacquard *et al.* 2017). To our best knowledge, only one study has investigated the induction of plant defenses during the heterotrophic phase of growth of common bean (Darrasse *et al.* 2010). Briefly, this study reported an absence of activation of bean seedling defenses by specific bacterial strains belonging to *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. However, the impact of other members of the seed microbiota, such as commensals, has not been yet studied.

The first goal of this study was therefore to investigate if the plant immune system is induced during radish seedling development in response to bacterial members of the seed



microbiota. For this we investigated the expression of six genes, PR1, EDS1, PR4, PDF1-2, ERS1 and Ein3, that are representatives of the salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene pathways. Pathogenesis-related (PR) proteins are a group of defense molecules induced by SA (PR1) and JA (PR4) (Vlot, Dempsey and Klessig 2009; Robert-Seilaniantz, Grant and Jones 2011). Enhanced Disease Susceptibility 1 (EDS1), is able to interact with diverse molecules giving a central role in the signaling pathway, it is particularly involved in the activation of SA pathway and plays a key role in the relationship between host and non-host pathogen interaction (Wiermer, Feys and Parker 2005). Induction of SA pathway will trigger Systemic Acquired Resistance (SAR), which is widespread in the whole plant and involved in plant protection (Ádám *et al.* 2018). Plant DeFensin gene (PDF1-2) is part of the JA and ethylene pathway (Manners *et al.* 1998). Ethylene Response Sensor-1 (ERS1) and Ethylene INsensitive protein 3 (EIN3) are part of ethylene pathway (Alonso and Stepanova 2004). ERS1 is one of the ethylene receptor and can be found on the endoplasmic reticulum membrane. In the absence of ethylene the receptor repress the ethylene pathway (Ju *et al.* 2012). Ein3 is a transcription factor which enables the activation of ethylene regulated genes (Solano *et al.* 1998).

The second objective was to identify genetic determinants involved in seedling colonization. For this purpose, we used randomly barcoded transposon mutagenesis sequencing (RB-TnSeq) for investing gene fitness of the phytopathogenic strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004). Results obtained in this work will give preliminary insight in the implication of the plant immune system and specific bacterial genetic determinants during the first step of seedling development. This fundamental knowledge will help to the design of seed microbial inoculants that are efficiently transmissible to the seedling.



**Figure 1: Experimental protocol.** A. Four replicates of 125 disinfected seeds were inoculated with Xcc8004\* (Xcc8004\* = RB-TnSeq mutant library) alone or in co-inoculation with a member of seed microbiota (CFBP13502, CFBP13503, CFBP13505, CFBP13506 or CFBP13549). As control (highlighted in red) we macerated 125 disinfected seeds and 125 non-disinfected seeds. Seeds were placed in culture boxes in a growth chamber (16 hours of daylight at 25°C / 8 hours of night at 22°C) for 96 hours. **B.** Seedlings resulting from seeds inoculated with the Xcc8004\* were harvested in Erlenmeyer and macerated in PBS. The DNA of these samples was extracted, barcodes amplified by PCR and finally sequenced using the NextSeq 550. **C.** For each condition, four biological samples were collected. Each sample consisted of the cotyledons or roots of three seedlings. After RNA extraction, the relative expression of the genes PR1, EDS1, PDF1-2, PR4, Ein3 and ERS1 was measured. The housekeeping genes ACTIN, TUB and GAPDH were used as a standard to compare the expression of the genes within all our samples. This figure has been realized with Biorender.

**Methods :*****Microbial strains and cultivation conditions***

We used a RB-TnSeq mutant library of strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004, (kindly provided by Alice Boulanger, LIPME, Toulouse, France). Xcc8004 RB-Tnseq mutant library is derived from Xcc8004, a spontaneous rifampicin-resistant strain (Turner *et al.* 2013), which derives from Xcc NCPPB 1145, a strain isolated from cauliflower in 1958. We also used five other seed-borne bacterial strains isolated from radish (Rezki *et al.* 2018), namely *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502, *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503, *Pantoea agglomerans* CFBP13505, *Pseudomonas viridiflava* CFBP13507 and *Pseudomonas fluorescens* CFBP13649. These strains represented the most abundant bacterial ASVs associated to radish seeds (Simonin *et al.* 2021). All strains are available at the CIRM-CFBP ([https://www6.inrae.fr/cirm\\_eng/CFBP-Plant-Associated-Bacteria](https://www6.inrae.fr/cirm_eng/CFBP-Plant-Associated-Bacteria)). All strains were routinely grown at 28°C in 1/10 strength Tryptic Soy Broth (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 and 5 g.l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Xcc8004 mutant library were grown at 28°C in MOKA rich medium (yeast extract 4 g.l<sup>-1</sup>, casamino acids 8 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.3 g.l<sup>-1</sup>) supplemented with 50 µg.ml<sup>-1</sup> of rifamycin and 50 µg.ml<sup>-1</sup> of kanamycin. All media were supplemented when needed with 15 g.l<sup>-1</sup> of agar.

Each bacterial strain studied was grown overnight in TSB10 and the mutant library was revived in MOKA for 6h, under constant agitation (150 rpm). Each bacterial culture and the Xcc8004 libraries were washed in MgSO<sub>4</sub>, centrifuged at 5000g, and resuspended in 10 mL at a final OD<sub>600nm</sub> of 0.1 (approximately 10<sup>8</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>). Six bacterial inocula were prepared: the Xcc8004 mutant library alone and the Xcc8004 mutant library co-cultured with each of the five selected strains at a 1:1 ratio (**Fig. 1**). Four independent replicates were performed for each inoculum. Bacterial concentration of each inoculum was verified *via* serial dilution on Petri dishes and numeration on TSA10 for bacterial strains and TSA10 supplemented with kanamycin and rifamycin for the mutant library.

***Seed to seedling transmission assay***

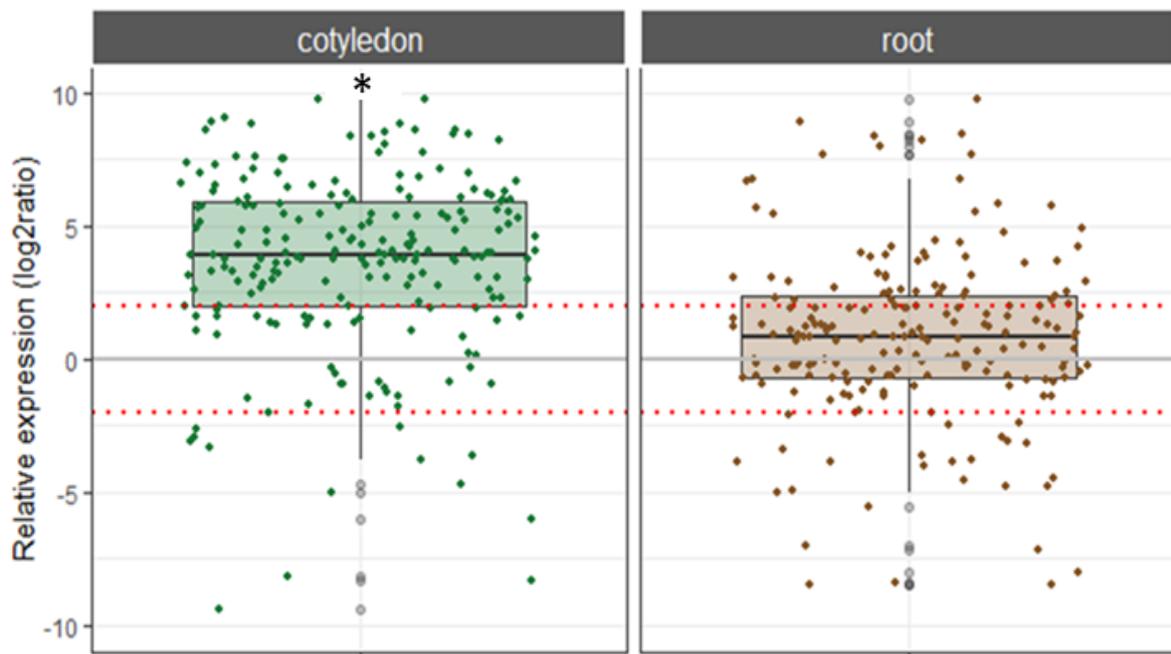
We prepared seven subsamples of approximately 500 radish seeds (*Raphanus sativus* var. Flamboyant 5) from a seed lot harvested in 2014 at the experimental station of the National Federation of Seed Multipliers (FNAMS, 47°28'012.42"N - 0°23'44.30"W, Brain-sur-l'Authion, France; seed Rezki *et al.*, 2018 for further information). Each subsample was surface-disinfected by performing a sonication step (1 min, 40 Hertz) followed by immersion in 96° ethanol solution



(1 min), bleach (5 min) and three water washes. A 125-seed incremental sample was soaked in a 40 mL pot containing bacterial suspension (see section “Preparation of bacterial inocula”) or  $\text{MgSO}_4$  during 1h30min at 8°C. After maceration, the seeds were dried for 10 minutes under a laminar flow hood and distributed in culture plates containing a sheet of sterile blotting paper, a folded paper and 40mL of water. One plate was use for each replicate of each condition and placed for 96 h in a growth chamber (conditions :16 hours of daylight at 25°C and 8 hours of night at 22°C). Cotyledons and roots of three different seedlings were collected per plate, immerse in liquid nitrogen and stored at -80°C. For the RB-TnSeq experiments, the remaining seedlings (approximately 110 seedlings per experiment) were harvested and placed in Erlenmeyer flasks. The seedlings were macerated for 15 minutes (28°C, 150 rpm) in 40mL of  $\text{MgSO}_4$  before being crushed for 2 minutes at full power with a lab blender (Stomacher, Mixwel, Alliance Bio Expertise, Guipry, France). Mixture was centrifuged (5000rpm, 5min, at room temperature) and the resulting pellet was resuspended in 4mL of  $\text{MgSO}_4$  and stored at -20°C for further DNA extraction.

#### ***RNA Extraction and Quantification of Gene Expression by Quantitative RT-PCR***

RNA from cotyledons and roots samples were extracted using the Nucleospin®RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Reverse-transcription of total RNA was carried out using the M-MLV Reverse Transcriptase according to the manufacturer’s protocol (ref M1701, Promega, Madison, WI, USA). Real-time qPCR was performed with MESA BLUE qPCR MasterMix according the manufacturer’s instructions (ref RT-SY2X-03 + WOUFLB, Eurogentec, Liège, Belgium). The transcript levels of the salicylic acid pathway (PR1 and EDS1), jasmonic acid pathway (PDF1-2 and PR4), and the ethylene pathway (Ein3 and ERS1) were monitored. All primers sequences were designed in this study (**Table S1**). Relative changes in defense gene expression of inoculated plants were compared to the relative expression of the same genes in control plants resulting from disinfected seeds (with a “depleted” microbiota), by using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method described by Schmittgen & Livak (2008). Three internal reference genes were used for normalization between samples (e.g., actin (ACTIN), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and tubulin (TUB)). Relative defense gene expression was calculated for each time point. The gene expression levels were obtained from four independent biological experiments, with two technical replicates. Induction and repression of the selected genes was considered as significant at an arbitrary threshold of  $\log_2(\text{ratio}) > |2|$ .



**Figure 2 : Differential expression of plant defenses in seedling compartments.** The relative expression (y-axis) of all selected genes (PR1, EDS1, PDF1-2, PR4, Ein3 and ERS1) is displayed in cotyledons (green) and roots (brown). Each point represents one sample. Significance was measured by a Wilcoxon test \* ( $P = 7.73 \cdot 10^{-14}$ ).

### Genome-wide mutant fitness assays

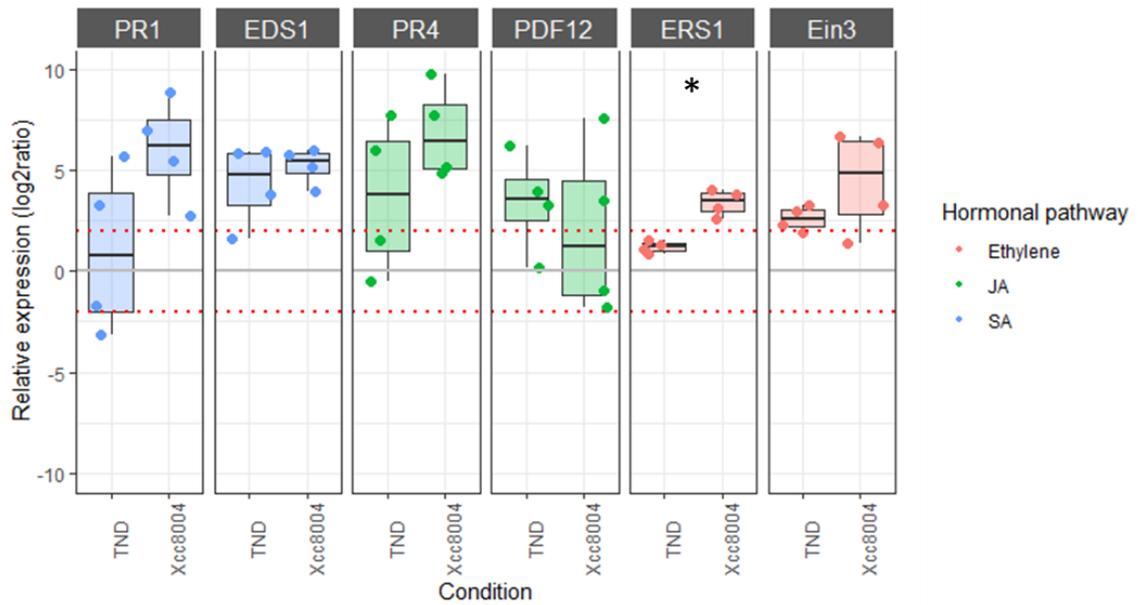
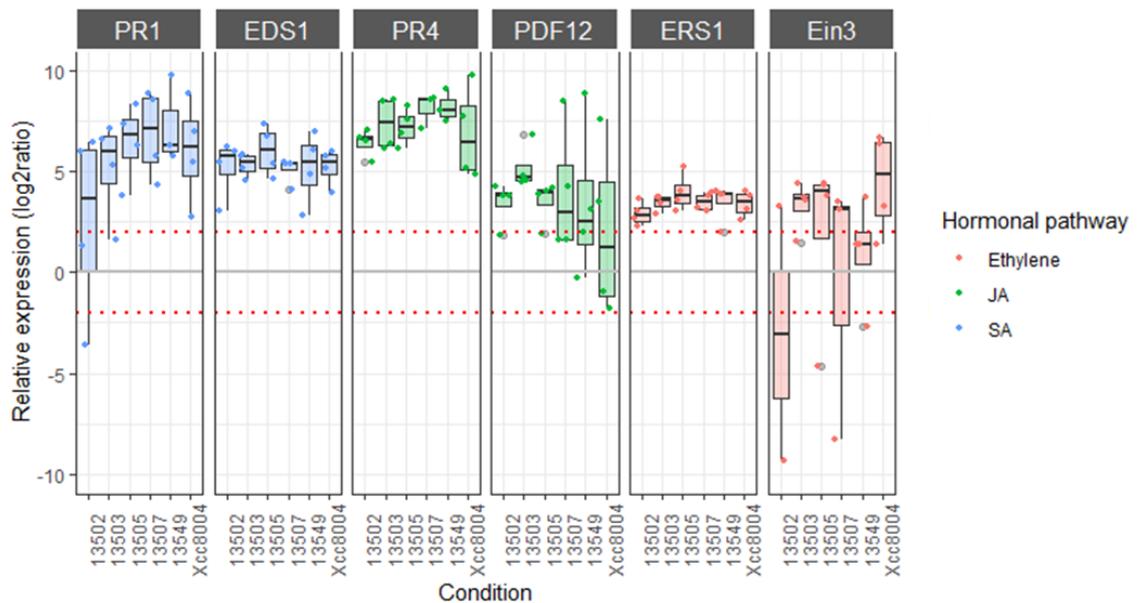
After collecting mutants on seedlings in our various condition (for details see section “Preparation of bacterial inocula”) we extracted genomic DNA from the Time0 and conditions samples using NucleoSpin® 96 Food kit (Macherey-Nagel) following the supplier’s recommendations. 200ng of DNA were amplified using Q5 Polymerase (NEB) and BarSeq primers (Wetmore 2015). PCR cycling conditions were as follows: denaturation at 98°C (4 min), 25 cycles at 98°C (30 sec), 55°C (30 sec) and 72°C (30 sec), and a final elongation at 72°C for 5 min. Amplicons were purified with magnetic beads and pooled in equimolar concentration. Concentration of the pool was monitored with quantitative PCR (KAPA Library Quantification Kit, Roche) and sequenced on NexSeq550 using High Output 150 cycles cartridge (Illumina, San Diego, CA).

To analyze our data, we used a pipeline developed to acquire fitness from raw sequencing data (Wetmore 2015). Mutant fitness scores were calculated as the normalized  $\log_2$  ratio of the abundance of its barcode in the library under our experimental conditions versus the “Time0”. Each mutant is associated with a unique barcode; thus the reads of a certain barcode characterize the abundance of the mutant inside the library. Gene fitness is calculated as the weighted mean of the fitness of each individual mutant. Genes fitness were then normalized to correct variation in copy number along the chromosome, the running median along the chromosome is zero. For each fitness score, we performed a t-like test. Finally, to identify significant genes we applied two thresholds  $|\text{fitness}| > 1$  and  $|t| > 5$ . To infer the function of Xcc8004 genes based on mutant phenotype, we used SEED database from the fitness browser ([fit.genomics.lbl.gov](http://fit.genomics.lbl.gov)). We also inferred gene function based on scientific articles published using PaperBLAST (Price 2018).

### Results :

#### ***Activation of defense genes in seedling.***

We first determined if the seed microbiota modified the relative expression of representative genes of the SA (PR1 and EDS1), JA (PDF1-2 and PR4) and ethylene (Ein3 and ERS1) pathways in comparison to disinfected, germ-free seed. The median expression value of all targeted genes (**Fig.2**) was significantly higher ( $P = 7.73 \cdot 10^{-14}$ , Wilcoxon test) in cotyledon ( $\log_2 = 3.95$ ) than root ( $\log_2 = 0.99$ ) (**Fig. 2**). We therefore focused only on cotyledons in the rest of the study, since no significant activation of plant defenses was observed for roots (**Fig. 2**).

**A.****B.****Figure 3: Relative expression of genes involved in plant defenses.**

Expression of the selected genes (PR1, EDS1, PDF1-2, PR4, Ein3 and ERS1) in cotyledons was assessed in seedling derived from native seeds (TND) and seed inoculated with Xcc8004 (A) or native seeds inoculated with Xcc8004 or seed-borne taxa (CFBP13502, CFBP13503, CFBP13505, CFBP13507 and CFBP13549) (B). The y-axis represents the relative expression in log<sub>2</sub>ratio of the six genes studied. The color of the boxplots and points represent the hormonal pathway to which the gene belongs (JA = jasmonic acid ; SA = salicylic acid). The dotted red horizontal lines represent thresholds at a relative expression of 2 and -2. \* indicate significance (p-value < 0.05) between TND and Xcc8004 condition for a gene.

In cotyledons derived from native seed samples, the median  $\log_2$  fold-change was greater than 2 for EDS1, PR4, PDF1-2 and Ein3 genes (**Fig. 3A**). This result indicated that the expression of these genes is induced by member(s) of the seed microbiota. Similarly, when the phytopathogenic strain Xcc8004 was seed-inoculated, the median  $\log_2$  fold-change was greater than 2, with the exception of PDF1-2 gene, which showed significant variations in expression between replicates.

To assess whether induction of defenses could be modulated by specific members of the seed microbiota, we investigated the expression of the targeted genes (PR1, EDS1, PDF1-2, PR4, Ein3 and ERS1), following co-inoculation with Xcc8004 and the five selected strains, namely *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502, *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503, *Pantoea agglomerans* CFBP 13505, *Pseudomonas viridiflava* CFBP13507 and *Pseudomonas fluorescens* CFBP13649. We did not observe any significant difference in gene expression whatever the inoculated strain (**Fig. 3B**). Altogether, these results indicated induction of representative genes of the SA, JA and ethylene pathways during emergence of radish seedlings.

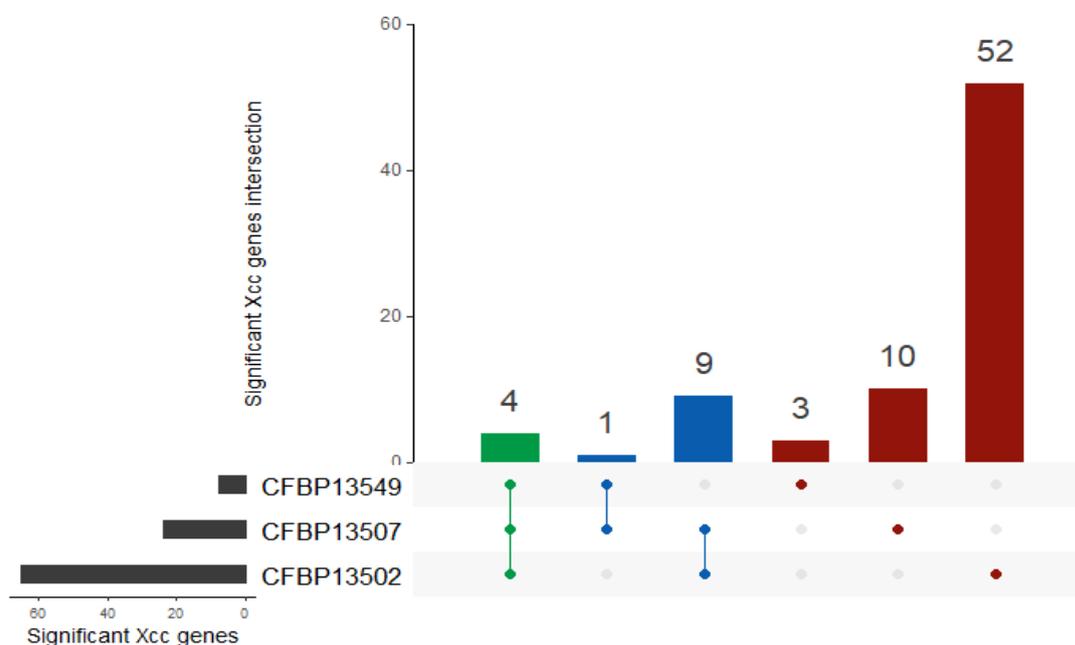
#### **Genetic determinants involved in bacterial transmission from seed to seedling**

The next objective of this study was to identify, genetic determinants involved in efficient seed to seedling transmission of Xcc8004. According to RB-TnSeq experiments, the fitness values of 22 genes were lower than  $\log_2 = -2$  in the four biological replicates, while only one gene had a fitness value higher than  $\log_2 = 2$  in the four biological replicates (**Table 1**). Of these 22 genes, the most represented functional category was related to nucleotide transport and metabolism. More precisely, seven gene encoding proteins involved in purine biosynthesis had a negative fitness value. In contrast, one unique gene encoding the sensory/regulatory protein RpfC had a positive fitness value (**Table 1**).

As a second step, we used RB-TnSeq for investigating Xcc8004 genetic determinants that were impacted by bacterial competition. Two of the five strains tested, *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 and *Pantoea agglomerans* CFBP13505 did not impact the fitness of any Xcc8004 genes. In contrast, a number of Xcc8004 genes were impacted by the strains *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502 ( $n=65$ ), *P. viridiflava* CFBP13507 ( $n=24$ ) and *P. fluorescens* CFBP13649 ( $n=8$ ) (**Fig. 4**). Genes that had a lower fitness value were associated with a range of broad functional categories including cell wall/membrane/envelope biogenesis ( $n=5$ ), inorganic ion transport and metabolism ( $n=5$ ) or intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport ( $n=5$ ) (**Table S2**). However, 40% of gene ( $n=32$ ) has not predicted function.

**Table 1 : Xcc8004 genetic determinants important for Xcc8004 transmission from the seed to the seedling.** Xcc1, Xcc2, Xcc3 and Xcc4 columns, are log 2-fold change of Xcc8004 mutant fitness between Time0 (control) and Xcc8004 on seedlings. We considered a gene significant when the log2Fold change was  $-2 > . < 2$  compared to the Time0.

locusId	Gene	Description	COG_category	Xcc1	Xcc2	Xcc3	Xcc4
Xcc-8004.4620.1	<i>dadX</i>	Alanine racemase	Amino acid transport and metabolism [E]	-3,10	-3,73	-4,50	-4,41
Xcc-8004.2011.1	<i>purE</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit	Nucleotide transport and metabolism [F]	-4,50	-2,09	-3,97	-5,39
Xcc-8004.1676.1	<i>purI</i>	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	Nucleotide transport and metabolism [F]	-4,28	-3,87	-3,22	-3,73
Xcc-8004.2012.1	<i>purK</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit	Nucleotide transport and metabolism [F]	-3,78	-4,46	-2,81	-3,47
Xcc-8004.659.1	<i>purH</i>	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	Nucleotide transport and metabolism [F]	-3,38	-3,21	-3,68	-3,08
Xcc-8004.657.1	<i>purD</i>	Phosphoribosylamine-glycine ligase	Nucleotide transport and metabolism [F]	-3,35	-2,49	-2,42	-3,49
Xcc-8004.4439.1	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Nucleotide transport and metabolism [F]	-3,21	-3,16	-2,32	-2,94
Xcc-8004.4073.1	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyltransferase	Nucleotide transport and metabolism [F]	-2,83	-2,57	-2,28	-3,28
Xcc-8004.1763.1	<i>gpmA</i>	Phosphoglyceromutase	Carbohydrate transport and metabolism [G]	-3,81	-4,49	-2,71	-2,70
Xcc-8004.957.1	<i>nagA</i>	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	Carbohydrate transport and metabolism [G]	-3,69	-2,83	-6,07	-3,69
Xcc-8004.2421.1	<i>phaC</i>	Poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase subunit PhaC	Lipid transport and metabolism [I]	-2,26	-3,15	-2,52	-2,56
Xcc-8004.3395.1		GntR family transcriptional regulator	Transcription [K]	-4,15	-4,03	-3,80	-3,28
Xcc-8004.5354.1	<i>recC</i>	Exodeoxyribonuclease V subunit RecC	Replication, recombination and repair [L]	-3,22	-2,15	-3,58	-2,97
Xcc-8004.4481.1	<i>xanB</i>	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	-3,36	-3,25	-3,08	-3,25
Xcc-8004.2387.1	<i>galU</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	-3,38	-2,89	-3,50	-3,75
Xcc-8004.3346.1		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	-3,26	-3,65	-2,75	-3,37
Xcc-8004.3536.1	<i>nosD</i>	Periplasmic copper-binding protein NosD	Inorganic ion transport and metabolism [P]	-4,59	-4,05	-5,35	-5,68
Xcc-8004.1334.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,63	-2,97	-2,97	-4,01
Xcc-8004.4596.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,61	-3,24	-2,17	-2,78
Xcc-8004.2420.1	<i>phaE</i>	PHA synthase subunit	Function unknown [S]	-2,84	-3,02	-2,19	-2,49
Xcc-8004.3855.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,74	-3,54	-2,77	-2,77
Xcc-8004.2217.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,15	-2,44	-2,87	-3,13
Xcc-8004.2898.1	<i>rpfC</i>	Sensory/regulatory protein RpfC	Signal transduction mechanisms [T]	2,07	2,29	2,47	3,08



**Figure 4 : Number of Xcc8004 genetic determinants important for Xcc8004 transmission when competed with seed-borne taxa.** Vertical bars represent number of significant genes in Xcc8004 for single conditions (CFBP13503, CFBP13507 and CFBP13549) in red, double-intersections in blue and in all conditions in green. Horizontal bars represent the number of significant genes per condition. Individual dot represents the number of genetic determinants significant in a unique condition, while dots connected with line represent genetic determinants significant in several conditions. We considered a gene significant when the log2Fold change was  $-2 > . < 2$  compared to the Time0. In addition, we kept only significant genetic determinants in coculture and not in the conditions with Xcc8004 alone.

Interestingly, four of the aforementioned genes had a negative fitness value following inoculation with the three strains. These genes were annotated as a periplasmic beta-glucosidase, a glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (*nagB*), a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*gpsA*) and a gene of unknown function. Moreover, strain CFBP13502 had the greatest effect on Xcc8004 gene fitness, although this could be under-estimated since only 3 replicates were analyzed instead of four replicates for the two other strains.

## **Discussion :**

### ***Seed microbiota induce seedling plant defenses***

Interaction between plants and microbes, especially the induction of plant defenses, have been widely studied during the autotrophic phase of plant development (Jones and Dangl 2006; Han 2019). In contrary, plant defenses induction during the heterotrophic phase of plant development has mostly been left out. Therefore, the first objective of this work, was to assess the influence of members of the seed microbiota on the expression of a number of genes involved in plant defenses during early stages of plant development. To date only one study, was interested in studying induction of defense pathway during the heterotrophic phase of plant development. The authors of this study, showed the absence of induction of hormonal defense pathways in bean seedling after seed inoculation of the phytopathogenic agent *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* or the non-host pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Darrasse *et al.* 2010). These results were consistent with our results, as we showed that seed-inoculation of Xcc8004, a plant pathogen of radish, induced the activation of the seedling defense genes to the same degree as seedlings derived from seeds inoculated with other members of the seed microbiota. However, in the study of Darrasse *et al.*, (2010) the induction of plant defenses genes were compared between inoculated seeds and native seeds. Therefore, this approach did not take into account the potential induction of plant defense genes by the indigenous seed microbiota. This is why, in our study we used as control, disinfected seeds, in order to decrease the amount of seed-borne taxa on seeds, allowing us to assess the impact of the microbiota on the induction of plant defense genes.

Expression of defense genes in seedlings derived from non-disinfected seeds was higher than from seedlings obtained from surface-disinfected seeds. Surface-disinfection cannot guarantee a complete sterility of the seed. Indeed, this method is efficient to remove most seed



microbial taxa, especially epiphytic microbes and microbes within the seed coat, but not endophytes (Figueiredo dos Santos *et al.* 2021). Therefore, our results suggested that induction of seedling defense genes was explained by the presence of epiphytes and seed coat-associated taxa or by a high microbial load on seeds. One hypothesis is that, microbial diversity located at the seed surface, thrived on seed surface due to low selection forces exerted by the host (Barret *et al.* 2015; Nelson 2018). However, when the seedlings emerge the microbial taxa initially associated to seed surface, would colonize the seedling tissues, therefore inducing seedling defense pathways. In the case of seed-surface disinfected seeds, only endophytes are present on seedlings. While endophytes are already inside plant tissues they would not induce expression of hormonal pathways in seedling. They may possess strategies to suppress MAMPs-triggered immunity as demonstrated on root commensals colonizers of *Arabidopsis thaliana* (Teixeira *et al.* 2021). However, this hypothesis does not fully explain the results obtained in this work. Indeed, the bacterial strains inoculated in this study were derived from surface-sterilized seeds of radish. Although this remains to be experimentally validated, these strains were therefore probably located within seed tissues and could be considered as endophytes. Induction of defense response following seed inoculation with these selected bacterial strains could therefore be related to the population size of inoculated bacteria. Even if it is well-established that defense pathways are involved in the reduction so bacterial load *in planta* (Kniskern, Traw and Bergelson 2007), no study to date decipher the importance of a minimal microbial load in the induction of plant defenses.

In conclusion, each selected bacterial strains, triggered induction of the targeted plant defense genes and were all efficiently transmitted to the seedling. Thus, it seems that the host immunity is not a key driver of seedling microbiota assembly. Other bacterial traits must therefore explain the shift of microbiota composition observed during germination and emergence.

### ***Genetic determinants involved in seedling colonization***

We have therefore, in a second time studied the genetic determinants involved in efficient transmission of the seed-transmitted pathogen Xcc8004 *via* a RB-TnSeq approach.

According to our experimental condition, mutants located within the *rpfC* gene had higher fitness in seedling. RpfC is a histidine kinase sensor that detects the diffusible signal factor (DSF) and activates the cyclic di-GMP phosphodiesterase RpfG (Cai *et al.* 2017). Activation of RpfG reduces the intracellular concentration of cyclic di-GMP, which ultimately results in production of extracellular polysaccharide (EPS) and extracellular enzymes (Barber *et al.* 1997). More recently



RpfC has been shown to positively regulate the expression of *hrpX*, a transcriptional activator of the Type III Secretion System (T3SS) (Jiang *et al.* 2018). Since production of T3SS and EPS are energetically costly, *rpfC* mutants could have a gain of fitness by using the “public goods” (e.g. T3SS and EPS) produced by neighboring cells. If this assumption is correct then it implies that T3SS and EPS production is induced in the seedling habitat, which remained to be experimentally validated.

We have also identified 22 genes with a lower fitness. Seven of these 22 genes were involved in purine biosynthesis. Interestingly, *de novo* purine biosynthesis has been already reported as an important virulence factor of several *Xanthomonas* species such as *Xanthomonas citri* (Tung and Kuo 2000), *Xanthomonas oryzae* (Chatterjee and Sonti 2005) and *Xanthomonas campestris* (Yuan *et al.* 2013). Moreover, purine biosynthesis has been reported as important for growth and virulence of other bacterial species including *Brucella abortus* (Truong *et al.* 2015), *Bacillus anthracis* (Jenkins *et al.* 2011) or *Escherichia coli* (Samant *et al.* 2008). Therefore, purine *de novo* biosynthesis could be a decisive trait for successful seedling colonization for other members of the seed microbiota. Among the other candidate's genes, two other interesting targets were highlighted as important for seedling colonization of Xcc8004. Firstly, the GlcNAc deacetylase gene *nagA*, that is altered in pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* and altered in its growth in xylem sap (Boulanger *et al.* 2021). Secondly, *xanB* that is involved in xanthane production and has a role for biofilm formation and twitching motility (Huang, Somers and Wong 2006).

In a second step, we identified Xcc8004 genetic determinants involved in microbial competition during seedling colonization. Among these genes, four were significantly impaired when Xcc8004 mutant library is co-inoculated with CFBP13503 (*Pseudomonas fluorescens*), CFBP13507 (*Pseudomonas viridiflava*) or CFBP13549 (*Pseudomonas fluorescens*). These four genes are involved in bacterial glycerol metabolism (Joseph *et al.* 2008). Competition for glycerol with other members of the seed microbiota could be therefore involved in such decrease of fitness. This finding is interesting, because screening of seedling transmitting taxa having the ability to metabolize glycerol in an efficient manner could limit the transmission of Xcc8004 *via* resource competition. In addition, *P. fluorescens* CFBP13502 seems to widely compete with Xcc8004. Indeed, 65 Xcc8004 genes were significantly impaired during Xcc8004+CFBP13502 transmission. This strain could be of interest for limiting seedling invasion of Xcc8004.



**Conclusion:**

These results show that the plant has control over the selection of its microbiota in the early stages of seed development. However, identity of taxa does not influence expression of defenses in seedlings. Greater number of seed-borne bacterial strains or consortia may be inoculated in seeds, to confirm the absence of variation in the induction of seedling defenses according to the seed microbiota composition. Furthermore, we identify candidate's genes explaining the ability of Xcc8004 to be transmitted to the seedling. The importance of these genes in seed to seedling transmission would need to be confirmed *via* reverse genetic and *in planta* inoculation. Finally, we show that one strain, CFBP13502, would be of great interest in limiting the transmission of the plant pathogen Xcc. In perspectives, future studies would be necessary to understand the molecular processes involved in competition between Xcc8004 and the seed-borne strain CFBP13502.

**Conflict of interest:**

The authors declare no conflict of interests

**References :**

- Ádám, A.L., Nagy, Z.Á., Kátay, G., Mergenthaler, E., and Viczián, O. (2018). Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1146.
- Alonso, J.M., and Stepanova, A.N. (2004). The Ethylene Signaling Pathway. *Science* 306, 1513–1515.
- Barber, C.E., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wilson, T.J.G., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P., and Daniels, M.J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology* 24, 555–566.
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, 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.



- Boulanger, A., Zischek, C., Lautier, M., Jamet, S., Rival, P., Carrère, S., Arlat, M., and Lauber, E. (2021). The Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Exploits N-Acetylglucosamine during Infection. *MBio* 5, e01527-14.
- Cai, Z., Yuan, Z.-H., Zhang, H., Pan, Y., Wu, Y., Tian, X.-Q., Wang, F.-F., Wang, L., and Qian, W. (2017). Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence. *PLOS Pathogens* 13, e1006304.
- Chatterjee, S., and Sonti, R.V. (2005). Virulence deficiency caused by a transposon insertion in the *purH* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Can. J. Microbiol.* 51, 575–581.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K., and Jacques, M.-A. (2010). Transmission of Plant-Pathogenic Bacteria by Nonhost Seeds without Induction of an Associated Defense Reaction at Emergence. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6787–6796.
- Figueiredo dos Santos, L., Fernandes Souta, J., de Paula Soares, C., Oliveira da Rocha, L., Luiza Carvalho Santos, M., Grativol, C., Fernando Wurdig Roesch, L., and Lopes Olivares, F. (2021). Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination. *FEMS Microbiology Ecology* 97.
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., and Schulze-Lefert, P. (2017). Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology* 55, 565–589.
- Han, G.-Z. (2019). Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist* 222, 70–83.
- Huang, T.-P., Somers, E.B., and Wong, A.C.L. (2006). Differential Biofilm Formation and Motility Associated with Lipopolysaccharide/Exopolysaccharide-Coupled Biosynthetic Genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology* 188, 3116–3120.
- Jenkins, A., Cote, C., Twenhafel, N., Merkel, T., Bozue, J., and Welkos, S. (2011). Role of Purine Biosynthesis in *Bacillus anthracis* Pathogenesis and Virulence. *Infection and Immunity* 79, 153–166.
- Jiang, B.-L., Jiang, G.-F., Liu, W., Yang, L.-C., Yang, L.-Y., Wang, L., Hang, X.-H., and Tang, J.-L. (2018). RpfC regulates the expression of the key regulator *hrpX* of the *hrp/T3SS* system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiol* 18, 103.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.



- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schär, J., Umesha, K.R., Luo, Q., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2008). Glycerol Metabolism and PrfA Activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 190, 5412–5430.
- Ju, C., Yoon, G.M., Shemansky, J.M., Lin, D.Y., Ying, Z.I., Chang, J., Garrett, W.M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M.L., *et al.* (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19486–19491.
- Kniskern, J.M., Traw, M.B., and Bergelson, J. (2007). Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Defense Pathways Reduce Natural Bacterial Diversity on *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 20, 1512–1522.
- Lohrke, S.M., Dery, P.D., Li, W., Reedy, R., Kobayashi, D.Y., and Roberts, D.P. (2002). Mutation of *rpiA* in *Enterobacter cloacae* Decreases Seed and Root Colonization and Biocontrol of Damping-Off Caused by *Pythium ultimum* on Cucumber. *MPMI* 15, 817–825.
- Manners, J.M., Penninckx, I.A.M.A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R.L., Morgan, A., Maclean, D.J., Curtis, M.D., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. (1998). The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol* 38, 1071–1080.
- Nelson, E.B. (2004). Microbial Dynamics and Interactions in the Spherosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42, 271–309.
- Nelson, E.B. (2018). The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil* 422, 7–34.
- Ofek, M., Hadar, Y., and Minz, D. (2011). Colonization of cucumber seeds by bacteria during germination. *Environmental Microbiology* 13, 2794–2807.
- Price, M.N. (2018). Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of unknown function. *Nature* 557, 503–509.
- Rezki, S., Champion, 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 and Soil* 422, 67–79.



- Roberts, D.P., Dery, P.D., Yucel, I., Buyer, J., Holtman, M.A., and Kobayashi, D.Y. (1999). Role of *pfkA* and General Carbohydrate Catabolism in Seed Colonization by *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2513–2519.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just jasmonate-salicylate Antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317–343.
- Rocheftort, A., Simonin, M., Marais, C., Guillerm-Eckelboudt, A.-Y., Barret, M., and Sarniguet, A. (2021). Transmission of Seed and Soil Microbiota to Seedling. *MSystems* 6, e00446-21.
- Samant, S., Lee, H., Ghassemi, M., Chen, J., Cook, J.L., Mankin, A.S., and Neyfakh, A.A. (2008). Nucleotide Biosynthesis Is Critical for Growth of Bacteria in Human Blood. *PLOS Pathogens* 4, e37.
- Shade, A., Jacques, M.-A., and Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology* 37, 15–22.
- Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rocheftort, A., Marais, C., Sarniguet, A., and Barret, M. (2021). Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *BioRxiv* 2021.06.08.447541.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by *ETHYLENE-INSENSITIVE3* and *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1*. *Genes & Development* 12, 3703–3714.
- Teixeira, P.J.P.L., Colaianni, N.R., Law, T.F., Conway, J.M., Gilbert, S., Li, H., Salas-González, I., Panda, D., Risco, N.M.D., Finkel, O.M., *et al.* (2021). Specific modulation of the root immune system by a community of commensal bacteria. *PNAS* 118.
- Torres-Cortés, G. (2018). Functional Microbial Features Driving Community Assembly During Seed Germination and Emergence. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Truong, Q.L., Cho, Y., Barate, A.K., Kim, S., Watarai, M., and Hahn, T.-W. (2015). Mutation of *purD* and *purF* genes further attenuates *Brucella abortus* strain RB51. *Microb Pathog* 79, 1–7.
- Tung, S.Y., and Kuo, T.T. (2000). Isolation and characterization of mutants of the citrus canker pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* that induce a distinct pattern of disease. *Can. J. Bot.* 78, 1002–1009.



- Turner, T.R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., and Poole, P.S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal* 7, 2248–2258.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47, 177–206.
- Wetmore, K.M. (2015). Rapid Quantification of Mutant Fitness in Diverse Bacteria by Sequencing Randomly Bar-Coded Transposons. *MBio* 6.
- Wiermer, M., Feys, B.J., and Parker, J.E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 383–389.
- Yang, L., Danzberger, J., Schöler, A., Schröder, P., Schloter, M., and Radl, V. (2017). Dominant Groups of Potentially Active Bacteria Shared by Barley Seeds become Less Abundant in Root Associated Microbiome. *Front. Plant Sci.* 8.
- Yuan, Z., Wang, L., Sun, S., Wu, Y., and Qian, W. (2013). Genetic and Proteomic Analyses of a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* purC Mutant Deficient in Purine Biosynthesis and Virulence. *Journal of Genetics and Genomics* 40, 473–487.



**Table S1 : Primers used in this study.**

<b>Primers</b>	<b>Sequences</b>
PR1_1_F	TGAGATGCGACAACGGTCAA
PR1_1_R	TTAGTAAGGCCACTCGCCC
EDS1_1_F	TTCTTCCCGGAGCCTCTTTG
EDS1_1_R	TTCTCTCTCCCAAGTGCCTG
PR4_1_R	CCGCTCAATCCGCTACCAA
PR4_1_F	ACGTCGAGCAATACGCACTT
PDF1_2_F	AGCACAGAAGTTGTGCGAGA
PDF1_2_R	GTGCTGGGAAGACATAGTTGC
EIN3_2_F	TTCAGTTCGACCAAACCGCT
EIN3_2_R	ACCCTAGAGTCGTGCCTGT
ERS1_1_F	TCGTGACCAGCTTATCGAGC
ERS1_1_R	TCCGAGCATGTAAGTCCATC
ACT_1_F	GCAAGAGCTGGATACCGCAAAG
ACT_1_R	CGATGAGCGATGGCTGGAAC
TUB_1_F	ACGTGGACGTGACTGAGTTC
TUB_1_R	CTGGAGCGTAGGAGGAAAGC
GAPDH_1_F	TGGAATCGCGTTGAGTGACA
GAPDH_1_R	TGATCAAGTCGACCACACGG



**Table S2: Xcc8004 genetic determinants important for Xcc8004 transmission when competed with seed-borne taxa.** CFBP13502, CFBP13507 and CFBP13549 columns, are log 2-fold change of the sum of Xcc8004 mutant fitness between Time0 (control) and Xcc8004 inoculated with one of these 3 strains on seedlings (CFBP13502 n=3 ; CFBP13507 n=4 ; CFBP13549 n=4). We considered a gene significant when the log2Fold change was  $-2 > . < 2$  compared to the Time0.

locusId	Gene Description	COG_category	CFBP13502	CFBP13507	CFBP13549
Xcc-8004.1727.1	Bifunctional diaminopimelate decarboxylase/aspartate kinase	Amino acid transport and metabolism [E]	0	0	-4,39
Xcc-8004.3086.1	Putative Glycine cleavage system transcriptional represso	Amino acid transport and metabolism [E]	-2,43	0	0
Xcc-8004.3752.1	Aminotransferase class-V	Amino acid transport and metabolism [E]	0	-3,7	0
Xcc-8004.645.1	Iron-sulfur cluster insertion protein ErpA	Energy production and conversion [C]	-5,73	0	0
Xcc-8004.1035.1	NADP-dependent malic enzyme	Energy production and conversion [C]	-2,39	-2,36	0
Xcc-8004.1236.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate transport and metabolism [G]	-3,35	0	0
Xcc-8004.1979.1	<i>tpiA</i> Triosephosphate isomerase	Carbohydrate transport and metabolism [G]	-4,36	-4,1	0
Xcc-8004.4824.1	Periplasmic beta-glucosidase	Carbohydrate transport and metabolism [G]	-3,38	-3,63	-4,33
Xcc-8004.4510.1	ABC transporter ATP-binding component	Carbohydrate transport and metabolism [G]	-3,25	0	0
Xcc-8004.956.1	<i>nagB</i> Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	-4,08	-4,31	-3,35
Xcc-8004.1871.1	LPS-assembly lipoprotein LptE	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	0	-3,83	0
Xcc-8004.2079.1	<i>gumB</i> Outer membrane exopolysaccharide (xanthan) exporter, GumB	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	-3,13	0	0



Xcc-8004.2086.1	<i>gumH</i>	GDP-mannose:cellobiosyl-diphosphopolyprenol $\alpha$ -mannosyltransferase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	-3,93	0	0
Xcc-8004.4102.1		Putative cell wall hydrolase	Cell wall/membrane/envelope biogenesis [M]	-4,17	-3,79	0
Xcc-8004.3862.1	<i>minC</i>	Z-ring positioning protein MinC	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning [D]	-3,14	0	0
Xcc-8004.4351.1	<i>ftsQ</i>	Cell division protein FtsQ	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning [D]	-3,46	-3,15	0
Xcc-8004.91.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,2	0	0
Xcc-8004.155.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-6,1	0	0
Xcc-8004.278.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,97	-2,75	0
Xcc-8004.514.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,38	0	0
Xcc-8004.1200.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,68	0	0
Xcc-8004.1272.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	0	-4,81	0
Xcc-8004.1511.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,78	0	0
Xcc-8004.1670.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-3,45	0	0
Xcc-8004.1823.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,49	0	0
Xcc-8004.2395.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,53	0	0
Xcc-8004.2561.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-3,12	0	0
Xcc-8004.3015.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-3,17	0	0
Xcc-8004.3322.1		Hypothetical protein	Function unknown [S]	-1,81	0	0



Xcc-8004.3710.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,23	0	0
Xcc-8004.4330.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,39	-4,1	0
Xcc-8004.4688.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,11	0	0
Xcc-8004.4820.1	Putative outer membrane protein-OmpA family	Function unknown [S]	-4,51	0	0
Xcc-8004.4945.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,97	0	0
Xcc-8004.5212.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	0	0	-4,32
Xcc-8004.5253.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-6,09	0	0
Xcc-8004.5405.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-3,72	0	0
Xcc-8004.1275.1	Aminopeptidase	Function unknown [S]	-3,29	0	0
Xcc-8004.1363.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,32	0	0
Xcc-8004.1686.1	<i>hutD</i> Histidine utilization regulatory protein <i>hutD</i>	Function unknown [S]	-5,08	0	0
Xcc-8004.1869.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-5,02	0	0
Xcc-8004.2505.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	0	0	-2,47
Xcc-8004.2639.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-3,75	0	0
Xcc-8004.3238.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,7	-2,46	-1,48
Xcc-8004.3435.1	Persistence and stress-resistance antitoxin <i>PasI</i>	Function unknown [S]	-4,23	0	0
Xcc-8004.3902.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-4,98	0	0



Xcc-8004.4189.1	Hypothetical protein	Function unknown [S]	-2,65	0	0
Xcc-8004.4711.1	Snoal-like domain protein	Function unknown [S]	-4,61	0	0
Xcc-8004.3054.1	Poly(A) polymerase I	Coenzyme transport and metabolism [H]	-2,83	0	0
Xcc-8004.627.1	Putative multidrug resistance protein	Inorganic ion transport and metabolism [P]	-4,11	0	0
Xcc-8004.2713.1	NarK/NasA family nitrate transporter	Inorganic ion transport and metabolism [P]	0	-3,41	0
Xcc-8004.3361.1	ABC transporter phosphate permease	Inorganic ion transport and metabolism [P]	-5,51	0	0
Xcc-8004.3363.1	Phosphate ABC transporter ATP-binding protein	Inorganic ion transport and metabolism [P]	-4,6	0	0
Xcc-8004.5174.1	<i>mntX</i> Manganese efflux pump	Inorganic ion transport and metabolism [P]	0	-4,87	0
Xcc-8004.527.1	Sigma 54 modulation protein / S30EA ribosomal protein	Translation, ribosomal structure and biogenesis [J]	-4,3	-3,99	0
Xcc-8004.1876.1	Specifically methylates the pseudouridine at position 1915 (m3Psi1915) in 23S rRNA	Translation, ribosomal structure and biogenesis [J]	-3,32	0	0
Xcc-8004.4170.1	50S ribosomal protein L25	Translation, ribosomal structure and biogenesis [J]	-4,18	0	0
Xcc-8004.4363.1	16S rRNA m4C1402 methyltransferase	Translation, ribosomal structure and biogenesis [J]	0	-3,34	-3,73
Xcc-8004.271.1	<i>gpsA</i> Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Lipid transport and metabolism [I]	-4,11	-4,22	-4,42
Xcc-8004.299.1	Lysophosphatidylcholine acyltransferase	Lipid transport and metabolism [I]	-3,23	0	0
Xcc-8004.4699.1	Putative outer membrane protein-OmpA family	Cell motility [N]	0	-4,21	0
Xcc-8004.1508.1	Chemotaxis protein CheW	Cell motility [N]	-4,16	0	0
Xcc-8004.2449.1	<i>glk</i> Glucokinase	Nucleotide transport and metabolism [F]	-2,95	0	0



Xcc-8004.968.1	Thiol disulfide interchange protein	Post-translational modification, protein turnover, and chaperones [O]	-2,49	0	0
Xcc-8004.4599.1	Hypothetical protein	Replication, recombination and repair [L]	0	-3,95	0
Xcc-8004.4752.1	<i>topA</i> DNA topoisomerase I	Replication, recombination and repair [L]	-3,65	0	0
Xcc-8004.5210.1	<i>rdgC</i> Recombination-associated protein RdgC	Replication, recombination and repair [L]	-2,98	-2,7	0
Xcc-8004.5332.1	Hypothetical protein	Replication, recombination and repair [L]	-3,89	0	0
Xcc-8004.2900.1	<i>rpfG</i> Cyclic di-GMP phosphodiesterase response regulator RpfG	Signal transduction mechanisms [T]	2,38	2,28	0
Xcc-8004.3782.1	Two-component system regulatory protein	Signal transduction mechanisms [T]	-4,43	0	0
Xcc-8004.787.1	Rrf2 family transcriptional regulator	Transcription [K]	-5,04	0	0
Xcc-8004.1434.1	Probable transcriptional regulator	Transcription [K]	-4,48	-3,97	0
Xcc-8004.4231.1	Two-component response regulator	Transcription [K]	0	-5,16	0
Xcc-8004.4783.1	LysR family regulatory protein	Transcription [K]	-3,89	0	0
Xcc-8004.5040.1	Probable transcriptional regulator	Transcription [K]	-4,59	0	0
Xcc-8004.950.1	<i>gspL</i> Type II secretion system protein	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport [U]	-4,17	0	0
Xcc-8004.1079.1	Hypothetical protein	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport [U]	-4,89	0	0
Xcc-8004.3726.1	<i>hrcJ</i> Type III secretion inner membrane ring lipoprotein, HrcJ	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport [U]	-3,37	0	0
Xcc-8004.4427.1	Putative general secretion pathway protein J	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport [U]	0	-4,46	0
Xcc-8004.5203.1	<i>tatB</i> Sec-independent protein translocase protein TatB	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport [U]	0	-4,31	0



### III. Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre mettent en évidence un contrôle de la plante dans la sélection de son microbiote dans les tous premiers stades de son développement. En effet, nous avons pu observer une induction des défenses dans les cotylédons significativement plus importante lorsque la graine est colonisée par des micro-organismes que lorsqu'elle a été désinfectée en surface. Cependant, l'identité des taxons sur les graines n'influence pas l'expression des défenses chez les plantules confirmant les résultats précédemment observés chez le haricot dans les travaux de Darrasse *et al.* (2010).

Par ailleurs, ces travaux sont une première étape de caractérisation des déterminants bactériens impliqués dans la colonisation de la plantule. Ces premiers gènes candidats obtenus chez Xcc8004 doivent maintenant être validés par des approches de génétique inverse et d'inoculation *in planta*. Cependant, afin de limiter le nombre de candidats et d'isoler des déterminants bactériens également important pour d'autres membres du microbiote, cette approche de RB-TnSeq va pouvoir être transposée aux cinq autres souches ciblées dans cette étude (CFBP13502, CFBP13503 ; CFBP13505, CFBP13507 et CFBP13549). Les banques de mutants RB-TnSeq pour ces souches sont actuellement en cours de création dans le laboratoire d'Adam Arkin (Lawrence Berkeley Lab, Berkeley, CA).

Enfin cette étude a montré qu'une souche de *Pseudomonas fluorescens* (CFBP13502) semble impacter de nombreux gènes de Xcc8004 lors de sa transmission à la plantule. Ainsi cette souche pourrait être un bon candidat à étudier pour limiter la transmission de Xcc8004 de la graine à la plantule. Cette compétition entre CFBP13502 et Xcc8004, portant un potentiel fort intérêt dans la limitation de la transmission de l'agent pathogène Xcc8004, va être abordée dans le chapitre suivant.



# CHAPITRE 4

*Limitation de l'incidence de l'agent pathogène  
Xanthomonas campestris pv. campestris sur les  
semences*



## I. Introduction

### a. Contexte

Les semences permettent la transmission de micro-organismes phytopathogènes entre les générations de plantes. Au vu des échanges commerciaux importants impliquant les semences, cette dispersion par les semences peut mener à l'émergence de maladies dans des zones initialement indemnes de ces agents pathogènes. Il n'existe pas, à ce jour, de méthode de lutte efficace contre la transmission des bactéries phytopathogènes aux semences. La transmission par les semences de micro-organisme ou de consortium de micro-organismes à fort potentiel compétitif vis-à-vis d'un agent pathogène ciblé représente une solution intéressante pour limiter sa transmission et son incidence. Cette compétition entre micro-organismes peut être réalisée par interférence ou par exploitation (**cf : partie « III. c. », Interactions inter-microbiennes**).

Dans le chapitre 2 de ma thèse, nous avons observé que la graine est colonisée par un taxon bactérien dominant. Cette faible diversité microbienne peut s'expliquer par une taille d'habitat limitée et apportant un nombre de ressources qualitativement et quantitativement limité. Parmi les ressources limitantes nécessaires à la croissance des bactéries dans les graines, on peut citer la concentration en minéraux, comme par exemple le fer. En effet, la localisation subcellulaire du fer et son état chélaté dans la graine ne le rend que peu disponible pour les bactéries du microbiote des semences (Hurrell *et al.* 1992; Ibeas *et al.* 2017). Cette ressource minérale est par conséquent une source de compétition pour les bactéries résidentes du microbiote des graines, qui vont irrémédiablement avoir besoin de fer pour leur bon développement.

### b. Objectifs et stratégies

Ce chapitre a pour premier objectif **d'identifier des bactéries isolées de graines de radis qui soient capables de moduler la croissance de l'agent pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)**.

Une première phase de criblage, nous a permis de sélectionner la souche *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502. En effet, en présence de Xcc, cette souche produit dans le milieu de culture un composé inhibant très fortement la croissance de Xcc. La caractérisation de ce composé ainsi que l'étude des déterminants génétiques impliqués dans sa production ont été analysés par diverses approches de : microbiologie, génomique, transcriptomique, RB-TnSeq et métabolomique.



c. Contributions des auteurs

Dans ces travaux, j'ai réalisé l'ensemble des tests de compétition bactérienne ainsi que la préparation des banques pour l'analyse RNA-Seq. La banque RB-TnSeq Xcc8004 a été fournie par Alice BOULANGER (LIPME, Toulouse). J'ai réalisé les expériences et les analyses des données RB-TnSeq au Lawrence Berkeley Lab (CA, USA) conjointement avec Lauren LUI. Matthieu BARRET et Martial BRIAND ont réalisé les analyses génomiques. L'ensemble des approches métabolomiques a été réalisé, traité et analysé par Dimitri BREARD et David GUILLET du SONAS. Tous les séquençages ont été réalisés avec l'aide de Muriel BAHUT du plateau ANAN (SFR QUASAV) ainsi que de Benjamin NAVET (CHU, Angers). J'ai analysé les données, réalisé la production des figures et la rédaction de l'article, conjointement avec Matthieu BARRET et Lauren LUI (Lawrence Berkeley Lab, CA, USA). L'ensemble des auteurs a participé à l'édition et à la révision du manuscrit présenté.



## II. Résultats

**Title: Identification of an atypical pyoverdine possessing antimicrobial activity, excreted by *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502 in presence of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

**Running title: Antimicrobial activity of a *Pseudomonas*-derived pyoverdine**

Guillaume Chesneau<sup>1</sup>, Lauren Lui<sup>2</sup>, Dimitri Breard<sup>3</sup>, Alice Boulanger<sup>4</sup>, Martial Briand<sup>1</sup>, Sophie Bonneau<sup>1</sup>, Morgan Price<sup>2</sup>, Andrew Hendrickson<sup>2</sup>, Torben Nielsen<sup>2</sup>, Alain Sarniguet<sup>1</sup>, David Guilet<sup>3</sup>, Adam Arkin<sup>2</sup>, Matthieu Barret<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

<sup>2</sup>Environmental Genomics and Systems Biology Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, United States of America.

<sup>3</sup>Univ Angers, SONAS, SFR QUASAV, Faculty of Health Sciences, Dpt Pharmacy, Angers, France

<sup>4</sup>LIPME, université de Toulouse, INRAE, CNRS, université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, France



**Introduction :**

Seed is the vector of dispersion of many micro-organisms (Simonin *et al.* 2021). Seed-transmitted microorganisms can have positive impact on seed vigor notably by (i) releasing the seed dormancy (Goggin *et al.* 2015), (ii) improving germination (Escobar Rodriguez *et al.* 2019) or (iii) protecting against damping-off (Chen *et al.* 2020a). In contrast a number of plant pathogens have been frequently reported as seed-transmitted (Baker and Smith 1966) including *Acidovorax citrulli* on watermelon (Dutta *et al.* 2012), *Clavibacter michiganensis* on tomato (Tancos *et al.*, 2013), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) and *Alternaria brassicicola* on a range of Brassicaceae (Thomma 2003; Pochon *et al.* 2012; Rezki *et al.* 2016; van der Wolf *et al.* 2019).

Control of seed-borne phytopathogenic fungi is routinely performed with fungicide. In contrast, no efficient chemical treatment is authorized for bacterial pathogens. Hence, seed sanitary control of bacterial phytopathogenic agents is mainly based on seed health testing. Seed coating with micro-organisms possessing biocontrol activities is one alternative to prophylaxis (Bashan *et al.* 2014). However, maintaining viable microbial inoculants under a prolonged period is difficult to achieve (O'Callaghan 2016). Another alternative method relies on floral-inoculation of the selected microorganism for its incorporation within seed tissues. This approach has been successfully employed for the delivery of the plant growth promoting bacterial strain *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN into seeds of various plant species (Mitter *et al.* 2017). Hence, floral-inoculation of biocontrol agents possessing strong competitive ability versus the targeted plant pathogen has the potential to decrease seed transmission of the latter (Barret *et al.* 2016). Indeed, seed is a habitat of limited size with the presence of one dominant taxa per seed (Newcombe 2018; Chesneau *et al.* 2021). Since *Selection* is the main ecological process governing assembly of the seed microbiota during seed development (Chesneau *et al.* 2021), microbial competition is likely to play an important role for successful seed transmission of microorganisms.

Microbial competition could be broadly divided into interference competition (i.e. production of antibiotics or toxins) or exploitative competition (i.e. uptake and use of nutrients; Granato, Meiller-Legend and Foster 2019). Evidence of resources overlap between Xcc8004 and other seed-borne taxa belonging to *Stenotrophomonas rhizophila* has previously been highlighted (Torres-Cortés 2018). Therefore, using microbes with overlapping resource consumptions may thus be an effective way to limit the presence of pathogens in the seed habitat. In addition, labile carbon compounds and accessibility to micronutrients by microbes is limited in seeds. For



example, iron has a subcellular localization in seeds that is not in agreement with bacteria localization (Ibeas *et al.* 2017). In addition, as iron is essential to support embryogenesis (Grillet, Mari and Schmidt 2014), seeds are rich in fiber-associated anti-nutritional factors (e.i : phytate, polyphenols, oxalate), which are potent inhibitors of iron absorption by external consumers (Hurrell *et al.* 1992; Lestienne *et al.* 2005). Hence, due to limited bioavailability of iron in seeds, competition for this micronutrient between microorganisms in the seed habitat is high, and therefore is an important process for microbial establishment. For example, seed bacterization with *Pseudomonas* strains possessing ability to trap iron *via* siderophores show antibiosis activity against *Rhizoctonia solani* (Deka Boruah and Dileep Kumar 2002). In addition, sequestration of seed-borne iron or mutation in bacterial iron transporter decreases the capacity of attachment of the bacterial strain *Pseudomonas putida* KT2440 to corn seed (Molina *et al.* 2005).

Overall, beyond seed habitat, microorganisms widely compete for iron in many microbial habitats, due to its low bioavailability in the environment because of its insoluble form Fe(III), that cannot be exploited by microorganisms (Griffin, West and Buckling 2004). Hence, microbes developed strategies to trap the iron, which is usually performed *via* siderophores synthesis. Siderophores are secondary metabolites excreted under iron-limiting condition, that scavenge iron from the environment and deliver it to cells *via* specific receptors (Kramer *et al.*, 2020). Among the variety of siderophores, pyoverdines are produced by *Pseudomonas* of the fluorescent group, which includes *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* and *P. syringae* group of species (Cezard, Farvacques and Sonnet 2015; Hesse *et al.* 2018). Pyoverdines are composed of a conserved fluorescent dihydroxyquinoline chromophore that is branched to a peptide chain through its carboxylic group and an acyl side branched to the amino group (e.g. Visca, Imperi and Lamont 2007). Composition of the peptide chain is highly variable between strains and has been employed for differentiated strains one from each other, a method called siderotyping (Meyer *et al.* 2008). Pyoverdine biogenesis starts in the cytoplasm, where non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) and Pvd enzymes assemble an acylated ferribactin, the peptide precursor of pyoverdines. The acylated ferribactin is then exported into the periplasm *via* PvdE and matured into the characteristic pyoverdine chromophore (Ringel and Brüser 2018). Mature pyoverdines are then secreted *via* various transporter systems. Once in the extracellular milieu, chelation with iron occurred *via* the chromophore group and ferri-pyoverdine is recognized by the outer membrane transporter FpvA and enters the bacterial cell, where iron is released (Cezard, Farvacques and Sonnet 2015).

**Table 1 : Bacterial strains used in the study.**

Strain (CFBP)	Species-Group	Host	Habitat	Year	Contigs	Genome size (Mb)	Reference
13502	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	1	6.201658	Torres-Cortes et al., 2019
13503	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	35	4.855517	Torres-Cortes et al., 2019
13504	<i>Pseudomonas koreensis</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	85	6.595509	Torres-Cortes et al., 2019
13505	<i>Pantoea agglomerans</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	48	4.863834	Torres-Cortes et al., 2019
13506	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	43	5.914838	Torres-Cortes et al., 2019
13507	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	1	5.925962	Torres-Cortes et al., 2019
13508	<i>Pseudomonas koreensis</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	1	6.031678	Torres-Cortes et al., 2019
13509	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	1	6.834697	Torres-Cortes et al., 2019
13510	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	55	6.347968	Torres-Cortes et al., 2019
13511	<i>Erwinia persicina</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	112	5.203109	Torres-Cortes et al., 2019
13512	<i>Paenibacillus</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	2	5.251198	Torres-Cortes et al., 2019
13513	<i>Plantibacter</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	7	4.231965	Torres-Cortes et al., 2019
13514	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	29	6.238853	Torres-Cortes et al., 2019
13515	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	150	5.869336	Torres-Cortes et al., 2019
13516	<i>Pantoea agglomerans</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	5	5.093661	Torres-Cortes et al., 2019
13517	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	63	5.954142	Torres-Cortes et al., 2019
13528	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	1	6.043101	Torres-Cortes et al., 2019
13529	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	1	4.637306	Torres-Cortes et al., 2019
13530	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	37	4.901530	Torres-Cortes et al., 2019
13531	<i>Bacillus simplex</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	187	5.965991	this study
13532	<i>Pantoea agglomerans</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	61	4.934344	Torres-Cortes et al., 2019
13533	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	58	6.107913	this study
13566	<i>Pantoea agglomerans</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2014	84	5.123550	this study
13569	<i>Pantoea agglomerans</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2015	36	4.797171	this study
13570	<i>Plantibacter</i>	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	172	4.158662	this study
13572	<i>Pseudomonas syringae</i> group	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	36	6.020391	this study
13573	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2013	54	6.390377	this study
13574	<i>Pseudomonas syringae</i> group	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2015	88	6.003323	this study
13575	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Seed	2015	34	4.805883	this study
13649	<i>Pseudomonas fluorescens</i> subgroup	Raphanus sativus Flamboyant5	Flower	2016	73	6.315997	this study
8340	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8004	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	unknown	1958	1	5.148708	Qian et al., 2005

*Xcc* is the agent of black rot of Brassicaceae and is identified as seed-borne (Roberts *et al.* 1999b; van der Wolf *et al.* 2019). Black rot of Brassicaceae is considered the most important disease of this botanical family, is spread worldwide, and can impact most cultivated but also wild Brassicaceae (Williams 1980; Bradbury 1986; Vicente and Holub 2013). Together with contaminated crop residues and infected weeds of the Brassicaceae family, seed is considered one of the major sources of primary inoculum for black knot disease (Randhawa and Schaad 1984). Therefore, the initial objective of this work was to identify and characterize seed-borne bacterial strains that are highly competitive against *Xcc*. During this screen, we were able to identify a bacterial strain belonging to the *P. fluorescens* subgroup (Hesse *et al.* 2018) that significantly reduced *Xcc* growth under our experimental conditions. We have subsequently identified that the compound responsible for this activity is specifically induced during interaction with *Xcc* and that it is related to a pyoverdine with an atypical structure. This bacterial strain, *P. fluorescens* CFBP13502, could be a promising candidate for limiting *Xcc* seed transmission through floral inoculation.

## **Methods :**

### ***Microbial strains and cultivation conditions***

Thirty bacterial strains covering the diversity of seed microbial communities were selected (**Table 1**). All these strains were isolated from radish seed samples collected in 2013, 2014 and 2015 (Rezki *et al.* 2018) except one strain isolated from radish flower in 2016 (Chesneau *et al.* 2020). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (*Xcc*8004) is a spontaneous rifampicin-resistant strain (Turner, Barber and Daniels 1984), which derives from *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB 1145, a strain isolated from cauliflower. All strains were routinely grown in 1/10 strength Tryptic Soy Broth (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 and 5 g.l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; hereafter TSA10%) at 28°C, supplemented when needed with 15 g.l<sup>-1</sup> of agar (hereafter TSA10%) and 50 µg.ml<sup>-1</sup> of rifamycin.

### ***Overlay assays***

A 24 h pre-culture of *Xcc*8004 was added to melted TSA10% (stabilized at 50°C) at a concentration of 10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. Once the medium had solidified, each of the 30 bacterial strains were spot-inoculated with 10µl tips in triplicate. Plates were incubated for 5 days at 18°C. The size of the inhibition halo was measured with ImageJ software. In order to normalize these data, the



area of each isolate was subtracted from the total area of the inhibition halo. Three independent experiments were performed, each experiment containing three technical replicates. Kruskal-Wallis test followed by *post-hoc* Dunn test were performed to compare Xcc8004 inhibition areas.

### **Cell-free supernatant assays**

All assays were performed in TSB10%. Mono-culture and co-culture of the 30 selected bacterial strains with Xcc8004 were performed at 28°C under constant shaking (150 rpm) during 24h using a starting OD<sub>600</sub> of 0.02. Culture supernatant was filtered through 0.22 µm filters. The resulting cell-free supernatant (CFS) was mixed 40% (v/v) with 50% (v/v) of 1/5 strength TSB and 10% (v/v) of a fresh cell suspension of Xcc8004 at an initial OD<sub>600</sub> of 0.2. Three hundred µl of the resulting mix was added per well of 96 Bioscreen well-plates. OD was recorded every hour during 24 hours, under constant shaking (150 rpm) at 28 °C. Iron and histidine supplementation were performed by adding a range of FeCl<sub>3</sub> and L-histidine concentration (from 0.3 µM to 50 µM final concentration) in the coculture or in the CFS. Times of generation were calculated using library growthcurver R package (version 0.3.1). We used Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc* test to assess significant differences between generation times, with a significant p-value considered when below 0.01. Significant differences in time of generation for bacteria growing in CFBP13502 CFS versus CFBP13502+Xcc8004 CFS were assessed using Wilcoxon test, with a significant p-value considered when below 0.01.

### **Genome sequencing and annotation**

Genome sequences of radish-associated bacterial strains were initially obtained through HiSeq 4000 PE150 sequencing (Torres-Cortés *et al.* 2019). In addition, DNA of *P. fluorescens* CFBP13502 was subjected to long-read sequencing. High-molecular weight DNA was extracted using the Masterpure kit with slight modifications. DNA was purified using phenol-chloroform extraction. Nanopore libraries were created using the SQK-LSK109 kit and sequenced on a MinION (Oxford Nanopore Technologies, UK) with a R9.4.1 flow cell. Basecalling of the nanopore reads was done with Guppy 4.0 software. Illumina libraries were prepared with the Illumina DNA prep kit and sequenced with 2X150bp reads on a NovaSeq 6000 (Illumina, USA). Illumina and nanopore reads were used as input to Unicycler (Wick *et al.* 2017) for hybrid genome assembly. Unicycler was run with default parameters. Visualization of gene cluster was performed with clinker and clustermap.js (Gilchrist and Chooi 2021).

### **RNA-Seq experiments**



Transcriptome analysis of *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502 was performed during co-culture with two strains (*Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 and Xcc8004) that produced a CFS with bacterial growth inhibition potential. Their transcriptome profiles were compared to co-culture of *P. fluorescens* CFBP13502 with two strains (*Pantoea agglomerans* CFBP13505 and *Pseudomonas viridiflava* CFBP13507) that do not trigger CFS with inhibitory activity. Four independent replicates were performed per co-culture at a starting OD<sub>600</sub> = 0.02. Total RNA of each strain was isolated by a modification of the method of Piper and associates (Piper *et al.* 1999). A 2-ml suspension of co-culture after 6 h growth was centrifuged 30 s at 14,000 × g. The pellet was resuspended in 600 µl of hot (65°C) Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and the mixture was shaken at 65°C for 5 min. After 5 min at room temperature, the cell debris were removed by centrifugation (2,500 × g, 5 min at 15°C) and the supernatant was transferred to a fresh tube. Chloroform (120 µl) was added to 600 µl of the supernatant and the mixture was vortexed vigorously 30 s. After 2 min at room temperature, the phases were separated by centrifugation at 12,000 × g for 15 min at 4°C and the upper phase (300 µl) was removed to a fresh tube. Isopropyl alcohol (250 µl) was added and the mixture was incubated at room temperature for 10 min. The precipitated RNA was collected by centrifugation at 12,000 × g for 20 min at 4°C. The supernatant was removed and the pellet was washed with 500 µl of 75% ethanol. A new pellet of RNA was collected by centrifugation at 7,500 × g for 5 min at 4°C and was air dried to near completion. The RNA was dissolved in 89 µl of sterile double-distilled H<sub>2</sub>O, and the preparation was treated with 1 µl of DNase (Ambion Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) (2 U µl<sup>-1</sup>) to remove contaminating DNA during 1 h at 37°C. The preparation was heated 10 min at 75°C to inactivate the DNase and RNA was ethanol precipitated and dissolved in 50 µl of double-distilled H<sub>2</sub>O.

RNA-Seq libraries were prepared with the QIAseq FastSelect -5S/16S/23S and QIAseq stranded total RNA Lib kits following manufacturer's instructions (Qiagen, Venlo, Netherlands). RNA fragmentation was performed at 89°C for 6 min. The quality of the resulting libraries was assessed with a Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) and concentration of libraries and subsequent equimolar pool was quantified with quantitative PCR using Illumina primers (Roche, Basel, Switzerland). The equimolar pool was sequenced with Illumina NextSeq550 using High Output 150 cycles cartridge (Illumina, San Diego, CA)

A median of 25 million paired-end reads (min= 16, max = 32) was obtained per sample. Quality and adapter trimming was performed with Trim Galore 0.6.3 (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) using Phred score of 20. Reads were mapped on *P.*



*fluorescens* CFBP13502 genome sequence with Salmon (Patro *et al.* 2017). Differentially-expressed genes (DEGs) were determined using DeSeq2 (Love, Huber and Anders 2014) at an adjusted *p-value* < 0.01 and a  $\log_2FC > |2|$ . Proteins function were inferred with PaperBLAST (Price and Arkin).

### Genome-wide mutant fitness assays

We performed pooled mutant fitness assays as described previously (Wetmore, 2015; Price, 2018). The Xcc8004 mutant library (ref) was revived in MOKA rich medium (Yeast Extract 4 g/l, Casamino acids 8 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g/l) supplemented with rifampicin, 50 µg/ml; kanamycin: 50 µg/ml; tetracycline: 5 µg/ml. Culture was left to grow at 28°C under constant agitation (150rpm) until reaching mid-log phase. Samples of the culture of Xcc8004 pooled mutants were collected as the “Time0” controls. The remaining culture was pelleted and washed two times then resuspended in 10mM MgSO<sub>4</sub>.

We incorporated the Xcc8004 mutant library (starting OD<sub>600</sub> = 0.02) in Xcc8004+CFBP13502 cell-free supernatant supplemented with TSB20, and compared, as controls, the fitness of this library in three other cell-free supernatants of the mutant library grown in (i) PBS, (ii) Xcc8004 cell-free supernatant and (iii) CFBP13502 cell-free supernatant (cultures were performed following 1/4/5 ratio described in “Phenotype screening for Xcc8004 inhibition” section). We collected the mutant population in our various conditions after 24 hours of growth, and extracted genomic DNA from the Time0 and condition samples using NucleoSpin® 96 Food kit (Macherey-Nagel) following the supplier’s recommendations. 200ng of DNA were amplified using Q5 Polymerase (NEB) and BarSeq primers (Wetmore, 2015). PCR cycling conditions were as follows: denaturation at 98°C (4 min), 25 cycles at 98°C (30 sec), 55°C (30 sec) and 72°C (30 sec), and a final elongation at 72°C for 5 min. Amplicons were purified with magnetic beads and pooled in equimolar concentration. Concentration of the pool was monitored with quantitative PCR (KAPA Library Quantification Kit, Roche) and sequenced on v3 150 Illumina cartridge (Illumina, San Diego, CA).

To analyze our data, we used a mature pipeline developed to acquire fitness from raw sequencing data. Mutant fitness scores were calculated as the normalized log<sub>2</sub> ratio of the abundance of its barcode in the library under our experimental conditions versus the “Time0”. Each mutant is associated with a unique barcode; thus the reads of a certain barcode characterize



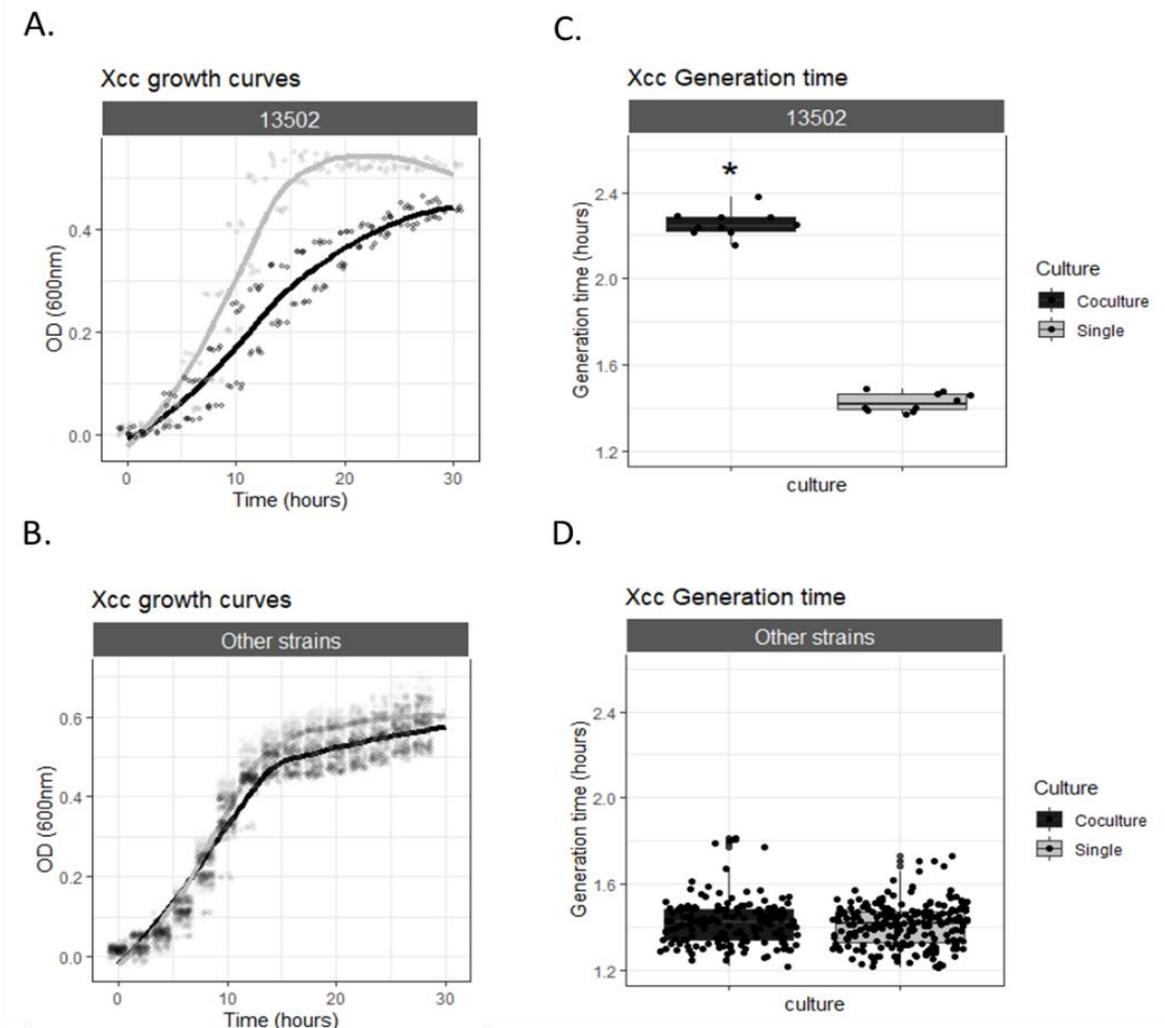
the abundance of the mutant inside the library. Gene fitness is calculated as the weighted mean of the fitness of each individual mutant. Gene fitness were then normalized to correct variation in copy number along the chromosome, the running median along the chromosome is zero. For each fitness score, we performed a t-like test. Finally, to identify significant Xcc8004 genes in CFBP13502+Xcc8004 CFS compared to our controls, we applied two thresholds  $|\text{fitness}| > 1$  and  $|t| > 5$ . To infer the function of Xcc8004 genes based on mutant phenotype, we used the SEED database from the fitness browser ([fit.genomics.lbl.gov](http://fit.genomics.lbl.gov)). We also inferred gene function based on scientific articles published using PaperBLAST.

### **Comparative metabolic profiling**

To identify the metabolite inhibiting Xcc8004 growth we performed comparative metabolic profiling of Xcc8004+CFBP13502 CFS, Xcc8004 CFS, CFBP13502 CFS and TSB CFS. The first step was to de-complexified our CFS. For this purpose, Xcc8004+CFBP13502 CFS was freeze-dried and submitted to a liquid/liquid extraction with H<sub>2</sub>O *versus* four different organic solvents, ethyl acetate (AcOEt), butanol (BuOH), dichloromethane (DCM) and methyl *tert*-butyl ether (MtBE). Each extract was evaporated then tested as previously described in “Cell-free supernatant assays on Xcc8004 inhibition” section, by replacing cell-free supernatant by our extracts. BuOH extract was selected due to its inhibitory effect on Xcc8004 growth. Thus, we performed liquid/liquid extraction (H<sub>2</sub>O/BuOH) on the fourth cell-free supernatant and analyzed each fraction *via* UPLC-HRMS/MS at a concentration of 100 µg/mL. A sample called “Mix” containing an equivalent mixture of the 4 fractions at 100 µg/mL is also prepared and will be used to align all the chromatograms obtained between them and to check the statistical analysis by PCA. Each sample is injected five times.

The analysis was performed using a Waters Acquity UPLC H-Class Series system. Chromatographic separation was carried out on an Acquity HSS T3 column (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm) heated at 25 °C. The mobile phase consisted of solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile), with gradient from 0 to 35% of B in 20 min then 35% to 100% of B in 5 min held for 3 min. The flow rate was set at 300 µL/min. The injection volume was 1 µL.

Mass spectrometry was performed on a Waters Xevo G2-XS system. The analyses were performed as two separated methods, one operated in positive electrospray ionization (ESI) mode and one in negative ESI mode. Mass data were acquired in Fast DDA sensitivity mode with a mass



**Figure 1: Increase of Xcc8004 generation time following supplementation with CFS from Xcc8004-CFBP13502 co-culture.** Xcc8004 growth was monitored in TSB10 medium supplemented with cell-free supernatants (CFSs). Colors correspond to CFSs obtained in pure culture (grey) or in co-culture with Xcc8004 (black). Five independent replicates were performed. **A.B.** Growth curves of Xcc8004 supplemented with CFBP13502 CFSs (13502) (**A**), or all other CFSs (**B**). Generation time of Xcc8004 (y-axis) supplemented with **CFBP13502** CFSs (**C**), or all other CFSs (**D**). Wilcoxon-test followed by post-hoc Dunn were performed to compare generation time ( $P < 0.01^*$ ).

range from 50-1200 m/z with a scan rate of 0.5 second in MS mode and 0.2 second in MS/MS mode.

The tuning parameters (positive and negative) were: capillary voltage 0.5 kV, sampling cone 40 V, cone voltage 80 V, source temperature 120°C, desolvation temperature 500°C, desolvation gas flow 100 L/h and cone gas flow 1000 L/h. The collision energy was set at 40 and 60 eV in positive and negative mode, respectively. Mass correction was performed with leucine enkephalin at 200 pg/mL, measured at 30 s intervals throughout each injection, at a flow rate of 5 µL/min. The ions monitored were 556.2766 and 554.2620 m/z in ESI+ and ESI-, respectively.

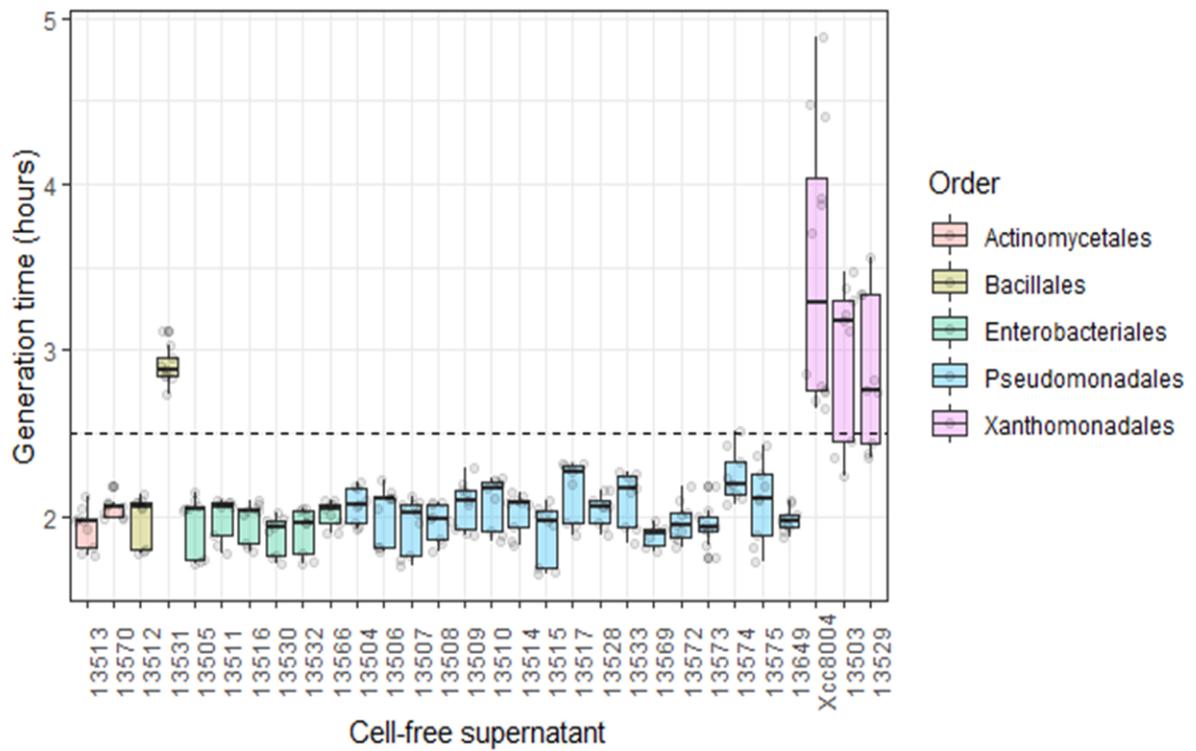
The data were then processed with the Progenesis Q1 software. Potential markers of interest were extracted from S-plots constructed following OPLS-DA, and markers were chosen based on their contribution to the variation and correlation within the data set.

## Results :

### Identification of bacterial cell free supernatant inhibiting Xcc8004 growth

Thirty bacterial strains isolated from radish seeds were tested for their competitive ability against the phytopathogenic strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004). These strains, belonging to five bacterial orders (Bacillales, Enterobacterales, Pseudomonadales, Sphingomonadales and Xanthomonadales) are representatives of bacterial populations associated with radish seeds according to the portion of the *gyrB* gene used for their molecular characterization (Simonin *et al.* 2021) (**Table 1**).

Competition was first assessed through overlay assays. Under these experimental conditions, three Pseudomonadales (CFBP13508, CFBP13509 and CFBP13549) significantly decreased ( $P < 0.01$ ) the growth of Xcc8004 (**Fig. S1**). We next assessed whether these growth reductions could be related to exometabolites production by exposing Xcc8004 to the CFSs of 30 other strains. As results, no strains exhibited a significant different generation time at a  $p$ -value = 0.001 (median = 1.42 hours) following supplementation of single CFS, compared to our control Xcc8004 (median = 1.33 hours) growing on its in own CFS (**Fig. S2 A and B**). However, we could still observe a delayed generation time of CFBP13533 (1.70 hours) compared to the control (**Fig. S2 A and B**). Overall, these results were not in accordance with the initial observations obtained on overlay assays. We therefore hypothesized that the induction of exometabolites production was triggered by the presence of Xcc8004 (**Fig. 1**). Hence, CFSs derived from co-cultures of Xcc8004



**Figure 2: Increase of Xcc8004 generation time following supplementation with CFSs from CFBP13502 co-cultured with each of the 30 seed-borne bacterial strains.** Generation time (hours) of Xcc8004 was measured in TSB10 supplemented with CFSs collected from co-culture of CFBP13502 and the seed-borne bacterial strains selected in this work (strain codes without “CFBP” on the x-axis). Bacterial strains are colored according to their taxonomic affiliation. Three independent replicates were performed for each CFS. Dashed line corresponds to a generation times of 2.5 hours.

with each of the 30 individual bacterial strains were added to TSB10 inoculated with Xcc8004. A highly significant ( $P = 0.001$ ) increase in generation time of Xcc8004 was observed for CFSs derived from co-cultures of Xcc8004 and CFBP13502 (2.25 hours, **Fig. 1** and **Fig. S2 C and D**) compared to our control Xcc8004 growing on its in own CFS. All the other CFSs derived from cocultures were not significant at a  $p$ -value of 0.001, with a median generation time of 1.43 hours. As previously observed with single CFS of CFBP13533, CFS coculture of CFBP13533 and Xcc8004 induced an increase of the time of generation of Xcc8004 at 1.80 hours.

The strong increase of Xcc8004 generation time (~140%) following supplementation of CFS from co-culture of Xcc8004 and CFBP13502 prompted us to investigate (i) the nature of the metabolite(s) produced by this specific co-culture (ii) the impact of the inhibitory cell free supernatant on seed-associated microbial taxa and (iii) the signal that triggered production of the CFBP13502 metabolites.

### **(i) Nature of the metabolite(s) produced by Xcc8004+CFBP13502**

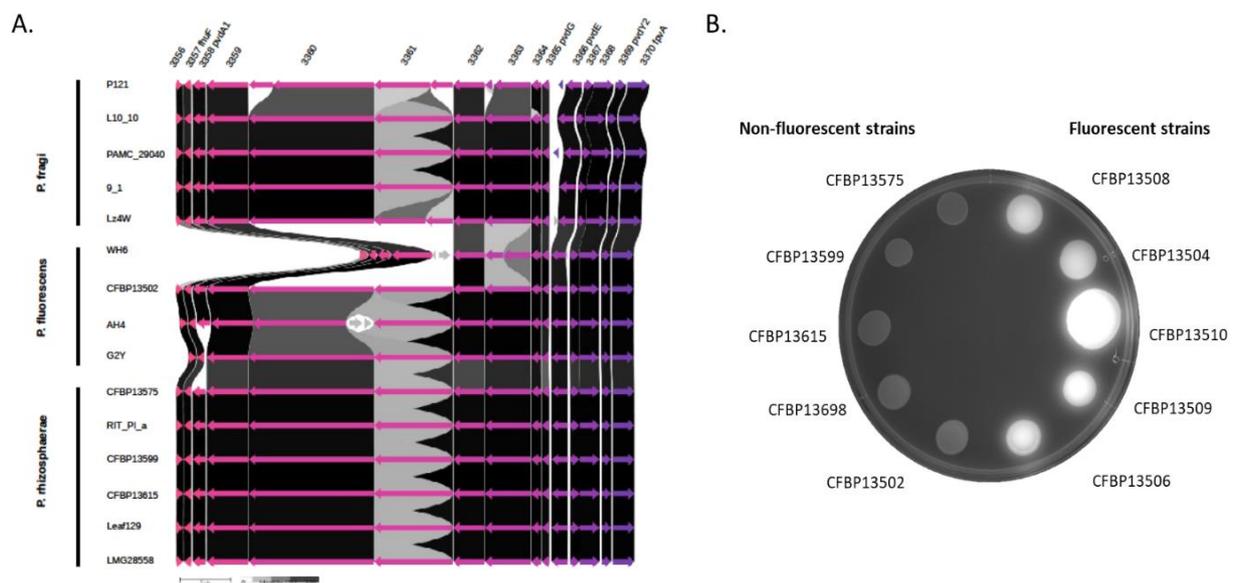
***Inhibitory metabolite(s) production by CFBP13502 is triggered by other members of the seed microbiota.***

To test whether other bacterial strains from the radish seed microbiota could also trigger the synthesis of the metabolites by CFBP13502, CFSs were collected from co-cultures between CFBP13502 and the 30 remaining bacterial strains. A strong inhibition of Xcc8004 generation time was observed for four of these CFSs. These CFSs were collected from co-cultures of CFBP13502 with (i) Xcc8004, (ii) *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503, (iii) *S. rhizophila* CFBP13529 and (iv) *Bacillus simplex* CFBP13531 (**Fig. 2**).

### ***Analysis of differentially-expressed genes of CFBP13502***

We performed transcriptome profiling of *P. fluorescens* CFBP13502 when co-cultured with (i) two strains (*S. rhizophila* CFBP13503 and Xcc8004) that produced a CFS with inhibitory activity (**Fig. 2**) and (ii) two strains (*Pantoea agglomerans* CFBP13505 and *P. viridiflava* CFBP13507) that did not trigger CFS with inhibitory activity (**Fig. 2**).

Expression was detected in 97% of the 5,614 predicted CDSs of *P. fluorescens* CFBP13502. Of the 149 differentially expressed genes ( $P < 0.01$ ,  $\log_2FC > |2|$ ), 80 were up-regulated during co-culture with *S. rhizophila* CFBP13503 and Xcc8004 (**Table S1**). Overall 31 up-regulated genes



**Figure 3 : Genetic organization of the cluster of genes presenting similarities with pyoverdine biosynthesis genes. A.** Cluster is composed of 15 genes over a 50 kb region. Locus tags are derived from *P. fluorescens* CFBP13502. Strains of *Pseudomonas* are divided into three subgroups. **B.** Visualization of *P. fluorescens* strains grown in King's B medium under UV.

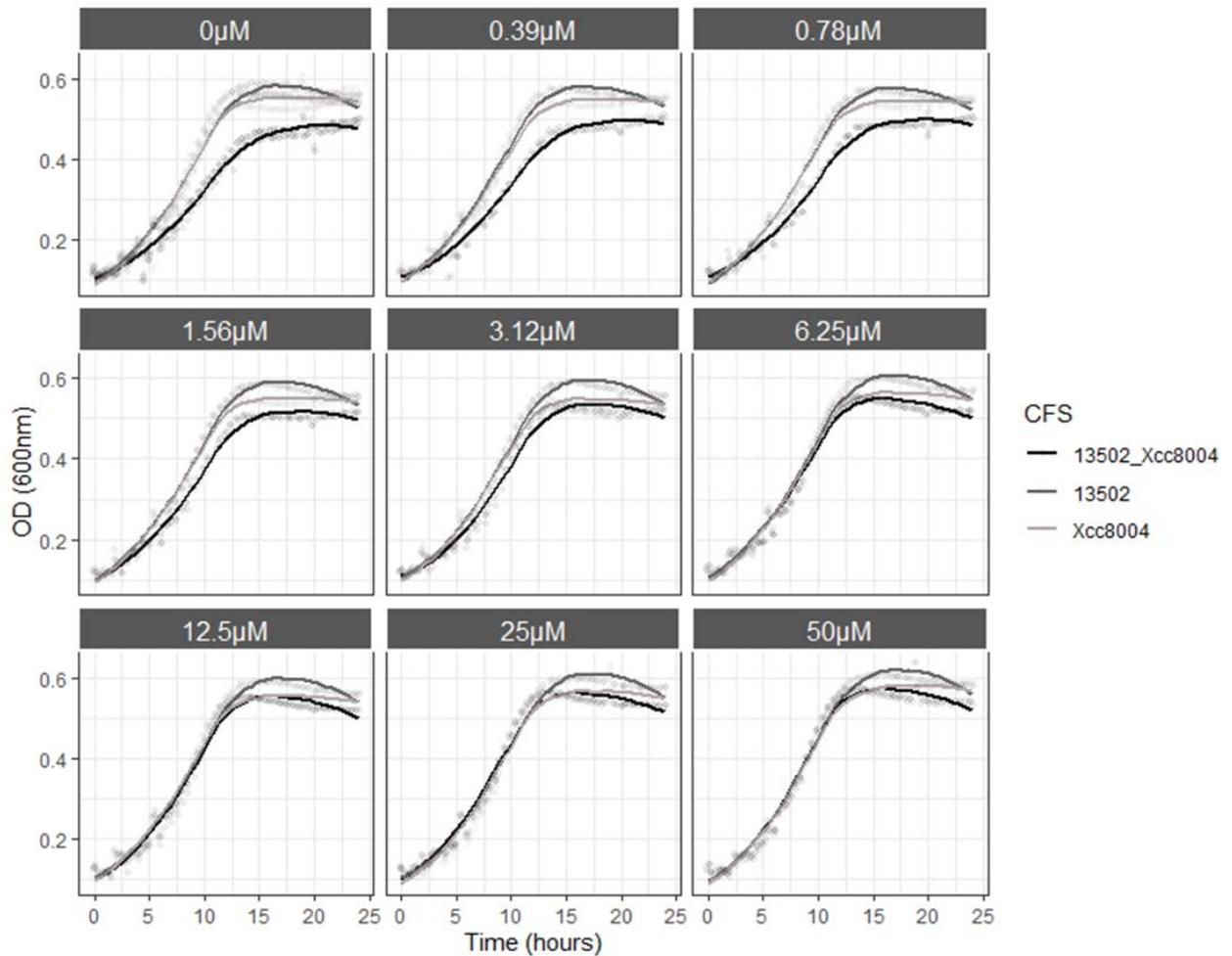
encode proteins involved in the catabolism of histidine, D-glucuronate, 2-ketogluconate and D-glucosamine. Moreover, 30 up-regulated genes have predicted roles in iron metabolism. These include seven predicted TonB-dependent transducers, five ECF sigma factors, two anti-sigma factors and genes whose products are involved in pyoverdine production. An additional operon of five genes (DNCPLIIA\_00886-DNCPLIIA\_00890) whose expression was induced under iron deprivation (Hassett *et al.* 1997) was also up-regulated under our experimental conditions. With regard to down-regulated genes, these mostly encode proteins involved in catabolism of 2,3 butanediol, anthranilate, 2-phenylethanol and glycine betaine.

### **Organization of a gene cluster putatively involved in pyoverdine production**

A gene cluster of 15 genes (DNCPLIIA\_03356-03370) over a 50 kb region (**Fig. 3**) was up-regulated in CFBP13502 during co-cultures with Xcc8004 and *S. rhizophila* CFBP13503. This gene cluster possesses sequence similarities to pyoverdine biosynthesis gene cluster according to protein similarity search. This gene cluster is present in 28 *Pseudomonas* strains (**Table S2**). These strains belong to *P. fragi*, *P. fluorescens* and *P. rhizosphaerae* (Hesse *et al.* 2018).

More precisely, the genetic cluster was composed of *fhuF* gene coding 2Fe-2S protein involved in iron removal from the sidérophore (Matzanke *et al.* 2004). It was associated with genes *pvdA1* (DNCPLIIA\_03358) and *pvdYII* (DNCPLIIA\_03369) encoding a L-ornithine N(5)-monooxygenase and an acetyltransferase, respectively (Lamont *et al.* 2006; Ringel and Brüser 2018). Five genes (DNCPLIIA\_03359 - DNCPLIIA\_03363) encoding non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) were also present within the genetic cluster. These protein-coding genes are probably involved in the synthesis of the peptide backbone of the pyoverdine. Genes encoding an aspartate  $\beta$ -hydroxylase (DNCPLIIA\_03364; (Reitz *et al.* 2019), the thioesterase PvdG (DNCPLIIA\_03365), the ABC transporter PvdE (DNCPLIIA\_03365) and the ferripyoverdine transporter FpvA (DNCPLIIA\_03370) were located downstream of the NRPS. Moreover, outside this genetic cluster, other up-regulated genes involved in pyoverdine production were also up-regulated. These included a small MbtH like protein (DNCPLIIA\_03923), the transcriptional regulator PvdS (DNCPLIIA\_03923) and a protein-coding gene *pvdA2* (DNCPLIIA\_03639) sharing 72% of identity at the nucleic acid level with *pvdA1* (**Table S1**).

Overall, transcriptomic analysis suggested the over-expression of all genes necessary to the synthesis of the acylated ferribactin, a pyoverdine precursor. Once in the periplasm the acylated ferribactin is known to be transformed into ferribactin chromophore acyl through



**Figure 4: Xcc8004 growth inhibition was relieved by FeCl<sub>3</sub> supplementation.** Xcc8004 growth was monitored in TSB10 supplemented with CFSs from CFBP13502 (13502, grey), Xcc8004 (light grey), and a co-culture of Xcc8004 and CFBP13502 (black). Each CFS was supplemented with various concentrations of FeCl<sub>3</sub> ranging from 0.39µM to 50µM. Three independent replicates were performed for each condition.

activities of PvdQ, PvdP, PvdO and PvdN and PtaA (Ringel and Brüser, 2018). According to BLASTp searches none of these protein-coding genes were present in the genome sequences of the 28 *Pseudomonas* strains possessing this genetic cluster. These results suggested that the “pyoverdine” of these bacterial strains were not composed of the characteristic 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline fluorophore.

Since the yellow-green fluorescence of the pyoverdine is due to 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline group, we assessed the fluorescence of strains CFBP13502, CFBP13698, CFBP13615, CFBP13599, CFBP13575 (lacking the genes responsible for fluorophore synthesis) in comparison with CFBP13508, CFBP13504, CFBP13510, CFBP13509 and CFBP13506 (*P. fluorescens* possessing genes involved in fluorophore synthesis) in King’s B media. As expected strains lacking fluorophore synthesis genes were non-fluorescent (**Fig 3B**), therefore confirming absence of the 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline group. As this part of pyoverdine is responsible for iron chelation through its catechol function, it raises the question if this chelating activity is functional in these strains?

#### ***Iron supplementation in Xcc8004+13502 culture-free supernatant relieve Xcc8004 inhibition***

If iron-chelation by pyoverdine was responsible for the observed CFS activity, then supplementation of TSB10 with FeCl<sub>3</sub> should relieve the growth inhibition. No improvement of Xcc8004 growth was observed when CFSs derived from pure culture of Xcc8004 and CFBP13502 were supplemented with FeCl<sub>3</sub> (**Fig. 4**). In contrast, a gradual increase in Xcc8004 growth was observed following supplementation of CFS from Xcc8004 and CFBP13502 co-culture with a range of FeCl<sub>3</sub> concentration (from 0,39μM to 50μM). The growth inhibition of Xcc8004 was completely abolished at a 6.25μM concentration of FeCl<sub>3</sub>. Hence, iron chelation by a compound produced by the CFS from Xcc8004 and CFBP13502 co-culture was probably involved in the increase of Xcc8004 generation time.

#### **Identification of the metabolite inhibiting Xcc8004 growth**

To identify the metabolite inhibiting Xcc8004 growth we performed comparative metabolic profiling of TSB medium, CFSs derived from pure cultures of CFBP13502 and Xcc8004 and CFS from the co-culture of CFBP13502 and Xcc8004. Four different organic solvents (AcOEt, BuOH, DCM and MtBE) were employed for liquid/liquid extraction with H<sub>2</sub>O. The BuOH-extracted fraction had the same anti-Xcc8004 activity than CFS of CFBP13502 and Xcc8004 (**Fig. S4**).

**Table 2: List of Xcc8004 genes involved in lower fitness of the mutant following supplementation with CFS of CFBP13502 and Xcc8004.** Log2 fold change for each gene in each condition compared to t0 (see “Methods” section for details). Columns (t-test) indicated significance between conditions. Differences in gene fitness were considered as significant at a  $P < 0.05$ . Annotations were derived from paperBLAST.

Locus_ID	Annotation	PBS	PBS	Xcc8004	Xcc8004	Xcc8004	CFBP13502	CFBP13502	CFBP13502	Co-culture	Co-culture	Co-culture	T-test (PBS vs co-culture)	T-test (Xcc8004 vs co-culture)	T-test (CFBP13502 vs co-culture)
Xcc-8004.29.1	hypothetical protein	-0,5	-0,5	-1,9	-1,3	-1,7	-0,8	-0,7	-1,1	-0,7	-1,1	-0,5	ns	0,03	ns
Xcc-8004.234.1	Bifunctional cardiolipin / phosphatidylethanolamine synthase	-1,0	-1,4	-1,1	-1,4	-1,5	-0,8	-0,5	-1,0	-1,0	-0,8	-1,0	ns	0,02	ns
Xcc-8004.495.1	YdcF family protein	-0,9	-0,2	-2,5	-2,7	-1,9	-1,6	-1,6	-1,5	-1,4	-1,6	-1,2	ns	0,03	ns
Xcc-8004.884.1	Rod shape-determining protein MreD	-2,3	-1,8	-3,3	-3,9	-2,7	-3,3	-3,9	-4,1	-3,1	-3,4	-3,0	0,02	ns	ns
Xcc-8004.1336.1	Two-component system sensor protein	-3,2	-3,1	-3,4	-3,6	-2,8	-3,6	-3,8	-3,0	-3,8	-3,7	-3,7	0,00	ns	ns
Xcc-8004.1359.1	Putative glutamine-dependent NAD <sup>+</sup> synthetase	0,2	0,3	0,0	0,1	-0,2	-1,5	-1,1	-1,7	-1,5	-1,4	-1,4	0,00	0,00	ns
Xcc-8004.2335.1	Putative glutathione/L-cysteine ABC exporter subunit CydC	-0,9	-1,1	-1,4	-2,0	-1,6	-1,1	-1,4	-1,6	-1,8	-1,4	-1,6	0,03	ns	ns
<b>Xcc-8004.2386.1</b>	<b>Polysaccharide biosynthesis protein</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,2</b>	<b>-0,8</b>	<b>-0,7</b>	<b>-0,8</b>	<b>-1,4</b>	<b>-1,4</b>	<b>-1,6</b>	<b>-1,2</b>	<b>-1,3</b>	<b>-1,2</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
<b>Xcc-8004.2406.1</b>	<b>Manganese transport protein MntH</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>-1,0</b>	<b>-1,0</b>	<b>-0,7</b>	<b>-2,2</b>	<b>-2,4</b>	<b>-2,4</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
Xcc-8004.2839.1	-	0,1	-0,8	-0,8	-0,7	-0,7	-0,2	-1,6	-0,2	-0,4	0,1	-0,1	ns	0,02	ns
Xcc-8004.2920.1	Ferrous iron transport protein B	-0,7	-0,6	-0,1	-0,3	-0,4	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,8	0,01	0,00	ns
Xcc-8004.3433.1	Outer membrane protein	-0,7	-0,7	-2,0	-1,8	-1,6	-2,0	-2,0	-2,3	-2,2	-2,1	-2,1	0,00	0,03	ns
Xcc-8004.4026.1	hypothetical protein	-0,2	-0,4	-0,3	-0,5	-0,2	-1,6	-1,4	-1,6	-1,0	-1,7	-1,2	0,03	0,01	ns
Xcc-8004.4286.1	Two-component system regulatory protein, DetR	-1,8	-1,2	-2,6	-3,1	-3,0	-2,9	-3,1	-2,6	-3,5	-3,1	-3,1	0,01	ns	ns
Xcc-8004.4457.1	Phosphatidylserine synthase PssA	-1,0	-1,0	-1,9	-2,8	-1,0	-1,8	-1,8	-1,4	-1,6	-1,6	-1,7	0,00	ns	ns
<b>Xcc-8004.4596.1</b>	<b>hypothetical protein</b>	<b>-0,9</b>	<b>-0,6</b>	<b>-0,7</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,5</b>	<b>-1,5</b>	<b>-1,7</b>	<b>-1,7</b>	<b>-1,4</b>	<b>-1,2</b>	<b>-1,3</b>	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
Xcc-8004.4737.1	hypothetical protein	-0,2	-0,1	-0,8	-0,6	-1,2	-2,2	-1,5	-2,2	-1,6	-1,8	-1,1	0,02	ns	ns
Xcc-8004.4824.1	Periplasmic beta-glucosidase	-0,5	-0,4	-0,9	-0,9	-1,1	-3,4	-3,0	-3,0	-3,5	-2,8	-3,6	0,00	0,00	ns
Xcc-8004.5193.1	Autotransporter assembly factor TamA	-2,7	-2,6	-2,8	-2,8	-3,0	-2,6	-2,5	-2,4	-2,7	-2,6	-2,4	ns	0,02	ns

From BuOH fractions we were able to identify twenty compounds specifically associated with Xcc8004+CFBP13502 CFS, seven after positive ionization and thirteen after negative ionization (**Table S3**). Interestingly, two components with the same retention time were significantly detected with both positive and negative ionizations and were absent in our three controls. These two components (retention time = 23.90 and 24.45) had a molecular weight of 1060.4395 Da and 1080.3968 Da (**Table S3, bolded**).

## **(ii) Impact of the inhibitory CFS on seed-associated microbial taxa**

### **CFS from the co-culture Xcc8004 and CFBP13502 increase the generation time of numerous seed-borne bacterial strains.**

If iron-chelation by pyoverdine was responsible for the increase of Xcc8004 generation time, then it was likely that this growth reduction effect also operates in other bacterial strains. The impact of the CFS collected from Xcc8004 and CFBP13502 co-culture was therefore assessed on the 30 bacterial strains employed in this work. This CFS significantly increased the generation time of 20 bacterial strains (**Fig. S5**) belonging to *Paenibacillus*, *Erwinia*, *Pantoea* and *Pseudomonas*. Strains not significantly impacted by this CFS were related to *P. fluorescens* (CFBP13502 and CFBP13514), *P. rhizosphaerae* (CFBP13575), *S. rhizophila* (CFBP13503 and CFBP13529), *Bacillus simplex* (CFBP13531), *Plantibacter* sp. (CFBP13513 and CFBP13570) and *Pantoea agglomerans* (CFBP13505 and CFBP13566).

### **Impact of the inhibitory CFS on Xcc8004 physiology**

To explore the impact of the inhibitory CFS on the physiology of Xcc8004 we employed a library of barcoded transposon mutants (Boulanger *et al.*, (unpublished)). The abundances of each barcoded mutant were estimated after growth in TSB10 supplemented with (i) PBS, (ii) CFS of Xcc8004, (iii) CFS of CFBP13502 and (iv) CFS of Xcc8004-CFBP13502 and compared to the initial inoculated sample (or T0). We could not identify genes resulting in a positive effect on the mutant fitness under our experimental conditions. In contrast 19 genes had a negative effect on the mutant fitness in at least one condition (**Table 2**). However, for only three genes (2406.1 and 4596.1) the mutant fitness were specifically altered (T-test<0.01) in the CFS of Xcc8004-CFBP13502 in comparison to PBS, and CFSs from pure cultures of CFBP13502 and Xcc8004 (**Table 2**). These genes encode a polysaccharide biosynthesis protein (Xcc-8004.2386.1), a manganese exporter protein (Xcc-8004.2406.1 or *mntE*) and a hypothetical protein (Xcc-8004.4596.1).



**(iii) What is the signal that triggered production of the CFBP13502 metabolites?*****Low iron availability***

Pyoverdine concentration was negatively correlated with iron bioavailability. Therefore, induction of pyoverdine synthesis in *P. fluorescens* CFBP13502 following interactions with Xcc8004, *S. rhizophila* and *B. simplex* could be the results of a stronger competition for iron in these co-cultures. This stronger competition would involve the synthesis of siderophores by both partners. In agreement with this hypothesis, we evaluated the capacity of a Xcc8004 strain impaired in the production of the siderophores through mutation in *xssA* (Pandey *et al.* 2017), to induce the production of the inhibitory activity when co-cultured with CFBP13502. As a result, the inhibitory activity was still present with Xcc8004 impaired in siderophore synthesis, excluding the hypothesis of low iron availability as inducer of the inhibitory activity (**Fig. S6**).

**Discussion :**

By screening a collection of seed-borne bacterial strains for antagonistic properties towards the seed-transmitted pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, we identify a culture free supernatant (CFS) that increases Xcc8004 generation time of a factor of 1.4. Interestingly, the antagonistic activity of this CFS is only observed during co-culture of the producer strain *P. fluorescens* CFBP13502 with some specific bacterial strains including Xcc8004. Although a number of experimental validations are still missing before concluding with certainty, it seems that the synthesis of an atypical pyoverdine by *P. fluorescens* CFBP13502 is responsible for the reduction of Xcc8004 generation time.

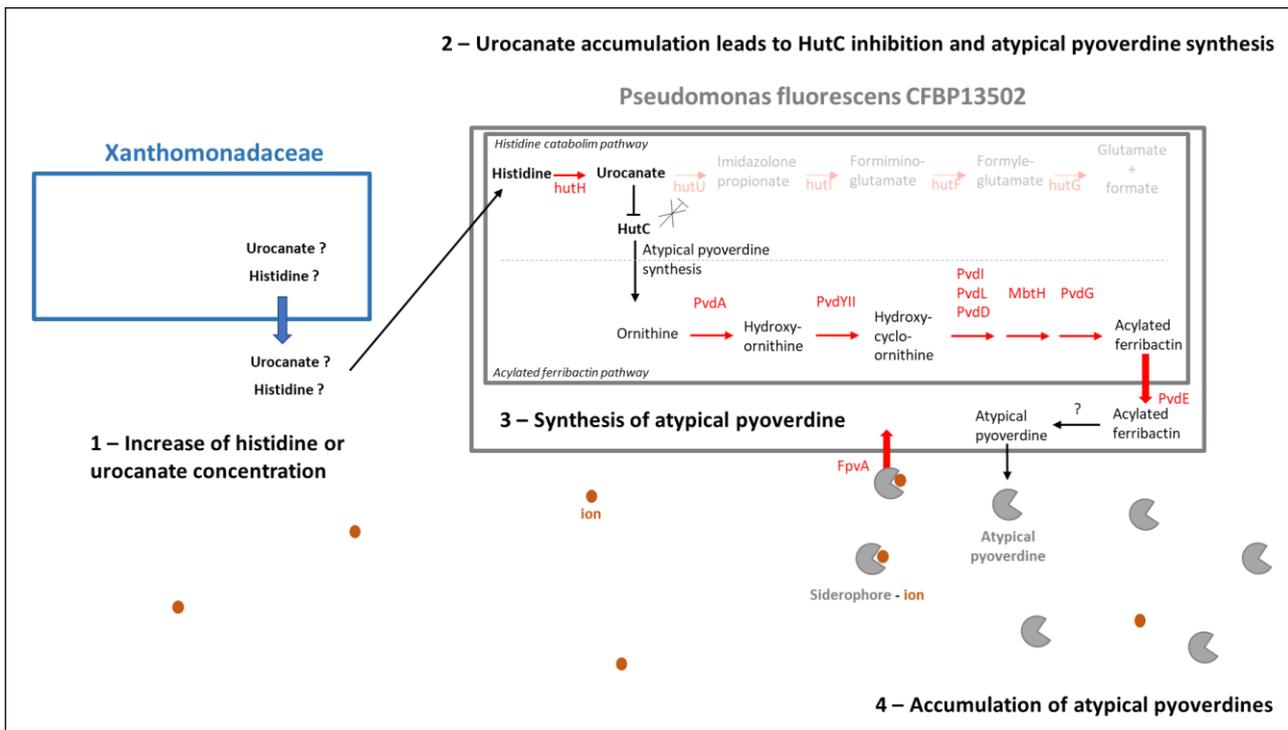
First, FeCl<sub>3</sub> supplementation of the CFS completely relieves growth inhibition, therefore suggesting that Xcc8004 growth is impacted by low iron availability. Decrease of fitness of *mntH* mutants agrees with this first observation. Indeed, under low iron concentration, Mn toxicity is exacerbated (Grunenwald *et al.*; Martin *et al.* 2015, 2017). Therefore, export of Mn through manganese exporter protein MntH can reverse the Mn cytotoxicity via extracellular export (Veyrier *et al.* 2011). Second, a set of genes involved in iron metabolism, notably through pyoverdine production, is induced in *P. fluorescens* CFBP13502 during interaction with strains that trigger antibacterial activity of the CFS. Notably, all the genes involved in the synthesis of the pyoverdine precursor, the acylated ferribactin and its transport (Ringel and Brüser 2018) are up-



regulated under these conditions. According to metabolomics we identify two potential candidate components of 530Da and 1080Da specifically associated with the inhibitory cell-free supernatant. Size of this components are in agreement with siderophore sizes ranging from 500 to 1500 Da (Hider & Kong, 2010), but only the 1080Da is concordant with pyoverdine size varying from 889 to 1746 Da (Meyer *et al.* 2008). Classically, siderophores are detected at very low concentrations in samples (Gledhill and Buck 2012), which is in agreement with the very low concentration found in our inhibitory CFS. Third, the generation time of 20 strains of diverse taxonomic affiliations increases following CFS supplementation, which supports the chelation of an essential element for bacterial growth. The strains not impacted by the CFS could uptake the ferripyoverdine by specific transporter such as FpvA (Butaitè *et al.* 2017; Gu *et al.* 2020b). This is at least the case for *P. fluorescens* CFBP13502 and *P. rhizosphaerae* CFBP13575. Interestingly, CFBP13503, CFBP13529 and CFBP 13531 are strains inducing the synthesis of the pyoverdine in coculture with CFBP13502 but they are not sensitive to the product. Overall, the hypothesis to explain resistant strain, could be their ability to synthesize xeno-siderophore, allowing them to import the pyoverdine. Indeed, some bacteria can utilize siderophores that are produced by other microbes *via* xeno-siderophore utilization or siderophore piracy (Crowley *et al.* 1991).

Although we use the term pyoverdine in this work, it remains to be demonstrated that we are indeed in the presence of this class of siderophore. Indeed, according to genome mining the protein-coding genes involved in the synthesis of the 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline fluorophore are not present in the genome sequence of *P. fluorescens* CFBP13502. The absence of fluorescence for this strain in King's B medium supports the lack of chromophore in the pyoverdine. Therefore, we propose that this siderophore is an atypical pyoverdine. Absence of 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline fluorophore in this atypical pyoverdine raises the question of the group involved in iron chelation, since the catechol group of the 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline fluorophore is involved in such process in classic pyoverdines (Cezard, Farvacques and Sonnet 2015). Further research is needed to fully characterize the original chemical structure of the CFBP13502 atypical pyoverdine.

Irrespective of its mode of action, the induction of the synthesis of the CFBP13502 atypical pyoverdine is also assessed in this study. Indeed, transcriptomic analysis reveals that genes associated with histidine catabolism (*hut*) are over-expressed in CFBP13502 when co-cultured with Xcc8004 or CFBP13503. In the bacterial strain *P. fluorescens* SBW25 the transcriptional repressor of *hut* genes, HutC, regulates a number of genes not involved in catabolism of histidine



**Figure 5 : Summary of functional behavior of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004) and *Pseudomonas fluorescens* CFBP13502 leading to the excretion of a Xcc8004 inhibitory compound. 1- Increase of histidine or urocanate concentration. 2- Urocanate accumulation leads to HutC inhibition and atypical pyoverdine synthesis. 3- Synthesis of the atypical pyoverdine. 4- Accumulation of the atypical pyoverdines. Red corresponds to overexpressed genes in *P. fluorescens* CFBP13502**

(Naren and Zhang, 2020). Of particular interest, pyoverdine concentration in SBW25 is increased in a *hutC* mutant (Naren and Zhang, 2020). Since the binding of HutC in  $P_{\text{hutU}}$  promoter decreases in the presence of urocanate, this metabolite could be responsible for the production of pyoverdine in CBP13502. Hence, urocanate concentration should be more important in the “inducing” co-culture in comparison to “non-inducing” co-culture. This hypothesis need to be confirmed, to validate the importance of urocanate concentration in the induction of the synthesis of the CFBP13502 atypical pyoverdine.

It is now well-established that pyoverdine is a source of competition between bacteria (Kramer, Özkaya and Kümmerli 2020). Interestingly, pyoverdine is known to be efficient for the inhibition of *Xanthomonas* species. For example, pyoverdine compound extracted from liquid culture of *Pseudomonas protegens* CS1 shows inhibition of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Michavila *et al.* 2017). In the same vein, bacterial filtrate containing pyoverdine diminishes the *X. axonopodis* pv. *passiflorae* population and passion fruit bacterial blight *in vivo* (Ribeiro *et al.* 2017). In conclusion, we identify a specific interaction between *P. fluorescens* CFBP13502 and Xcc8004 that induce excretion of an atypical pyoverdine possessing an antimicrobial activity. With the aim of creating a microbial resource to be used in biological control, this interaction is of interest because the excretion of the compound is induced when the *Pseudomonas* interacts with a narrow range of species, mainly Xanthomonadales. Therefore, introduction of *P. fluorescens* CFBP13502 in seed for the purpose of controlling the plant pathogen Xcc8004 will induce the excretion of the antimicrobial compound only in the presence of the pathogen, and will not disturb the native seed microbiota and the surrounding environment.

### **Conclusion:**

Altogether, these results can be summarized in a model represented in **Figure 5**. 1- Xanthomonads strains increases the urocanate concentration in the media. 2- In CFBP13502, high urocanate concentration leads to urocanate binding to HutC, inducing HutC repression. HutC repression leads to increasing histidine catabolism and induction of the synthesis of the atypical pyoverdine. 3- CFBP13502 synthesizes the acylated ferribactin which is a precursor of an atypical pyoverdine that does not include the chromophore. 4- This atypical pyoverdine is accumulated in the media. Therefore, when the CFS of this co-culture (highly concentrated in iron chelator), is applied to Xcc8004, a large amount of iron in the medium is chelated and is not bioavailable for the growth of Xcc8004, which cannot grow.



**Conflict of interest :**

The authors declare no conflict of interests

**References :**

- Baker, K.F., and Smith, S.H. (1966). Dynamics of Seed Transmission of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 4, 311–332.
- Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A., and Jacques, M.-A. (2016). Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology* 17, 791–795.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., and Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* 378, 1–33.
- Bradbury, J.F. (1986). *Guide to plant pathogenic bacteria* (CAB international).
- Butaitė, E., Baumgartner, M., Wyder, S., and Kümmerli, R. (2017). Siderophore cheating and cheating resistance shape competition for iron in soil and freshwater *Pseudomonas* communities. *Nat Commun* 8, 414.
- Cezard, C., Farvacques, N., and Sonnet, P. (2015). Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Current Medicinal Chemistry* 22, 165–186.
- Chen, T., Nomura, K., Wang, X., Sohrabi, R., Xu, J., Yao, L., Paasch, B.C., Ma, L., Kremer, J., Cheng, Y., *et al.* (2020). A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature* 580, 653–657.
- Chesneau, G., Torres-Cortes, G., Briand, M., Darrasse, A., Preveaux, A., Marais, C., Jacques, M.-A., Shade, A., and Barret, M. (2020). Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiol Ecol*.
- Chesneau, G., Laroche, B., Préveaux, A., Marais, C., Briand, M., Marolleau, B., Simonin, M., and Barret, M. (2021). Single seed microbiota: assembly and transmission from parent plant to seedling.
- Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P., and Szaniszló, P.J. (1991). Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. In *Iron Nutrition and Interactions in Plants: “Proceedings of the Fifth International Symposium on Iron Nutrition and*



- Interactions in Plants”, 11–17 June 1989, Jerusalem, Israel, 1989, Y. Chen, and Y. Hadar, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 213–232.
- Deka Boruah, H.P., and Dileep Kumar, B.S. (2002). Plant disease suppression and growth promotion by a fluorescent *Pseudomonas* strain. *Folia Microbiol* 47, 137–143.
- Dutta, B., Avci, U., Hahn, M.G., and Walcott, R.R. (2012). Location of *Acidovorax citrulli* in Infested Watermelon Seeds Is Influenced by the Pathway of Bacterial Invasion. *Phytopathology* 102, 461–468.
- Escobar Rodriguez, C., Antonielli, L., Mitter, B., Trognitz, F., and Sessitsch, A. (2019). Heritability and functional importance of the *Setaria viridis* L. bacterial seed microbiome. *Phytobiomes Journal*.
- Gilchrist, C.L.M., and Chooi, Y.-H. (2021). clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics* 37, 2473–2475.
- Gledhill, M., and Buck, K. (2012). The Organic Complexation of Iron in the Marine Environment: A Review. *Frontiers in Microbiology* 3, 69.
- 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* 115, 293–301.
- Granato, E.T., Meiller-Legrand, T.A., and Foster, K.R. (2019). The Evolution and Ecology of Bacterial Warfare. *Current Biology* 29, R521–R537.
- Griffin, A.S., West, S.A., and Buckling, A. (2004). Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* 430, 1024–1027.
- Grillet, L., Mari, S., and Schmidt, W. (2014). Iron in seeds – loading pathways and subcellular localization. *Frontiers in Plant Science* 4, 535.
- Grunenwald, C.M., Choby, J.E., Juttukonda, L.J., Beavers, W.N., Weiss, A., Torres, V.J., and Skaar, E.P. Manganese Detoxification by *MntE* Is Critical for Resistance to Oxidative Stress and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *MBio* 10, e02915-18.
- Gu, S., Yang, T., Shao, Z., Wang, T., Cao, K., Jousset, A., Friman, V.-P., Mallon, C., Mei, X., Wei, Z., *et al.* (2020). Siderophore-Mediated Interactions Determine the Disease Suppressiveness of Microbial Consortia. *MSystems* 5.



- Hassett, D.J., Howell, M.L., Sokol, P.A., Vasil, M.L., and Dean, G.E. (1997). Fumarase C activity is elevated in response to iron deprivation and in mucoid, alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of *fumC* and purification of native *fumC*. *Journal of Bacteriology* 179, 1442–1451.
- Hesse, C., Schulz, F., Bull, C.T., Shaffer, B.T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K.A., Varghese, N., Elbourne, L.D.H., Paulsen, I.T., *et al.* (2018). Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology* 20, 2142–2159.
- Hurrell, R.F., Juillerat, M.A., Reddy, M.B., Lynch, S.R., Dassenko, S.A., and Cook, J.D. (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 56, 573–578.
- Ibeas, M.A., Grant-Grant, S., Navarro, N., Perez, M.F., and Roschztardt, H. (2017). Dynamic Subcellular Localization of Iron during Embryo Development in Brassicaceae Seeds. *Frontiers in Plant Science* 8, 2186.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., and Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 18, 152–163.
- Lamont, I.L., Martin, L.W., Sims, T., Scott, A., and Wallace, M. (2006). Characterization of a Gene Encoding an Acetylase Required for Pyoverdine Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 188, 3149–3152.
- Lestienne, I., Icard-Vernière, C., Mouquet, C., Picq, C., and Trèche, S. (2005). Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry* 89, 421–425.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.
- Martin, J.E., Waters, L.S., Storz, G., and Imlay, J.A. (2015). The *Escherichia coli* Small Protein MntS and Exporter MntP Optimize the Intracellular Concentration of Manganese. *PLOS Genetics* 11, e1004977.
- Martin, J.E., Lisher, J.P., Winkler, M.E., and Giedroc, D.P. (2017). Perturbation of manganese metabolism disrupts cell division in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 104, 334–348.



- Matzanke, B.F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A.X., and Hantke, K. (2004). FhuF, Part of a Siderophore–Reductase System. *Biochemistry* 43, 1386–1392.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., and Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* 21, 259–271.
- Michavila, G., Adler, C., Gregorio, P.R.D., Lami, M.J., Santo, M.C.C.D., Zenoff, A.M., Cristobal, R.E. de, and Vincent, P.A. (2017). *Pseudomonas protegens* CS1 from the lemon phyllosphere as a candidate for citrus canker biocontrol agent. *Plant Biology* 19, 608–617.
- 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.
- Molina, M.A., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Muñoz, N., Ramos, J.L., and Espinosa-Urgel, M. (2005). Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 7, 443–449.
- Newcombe, G. (2018). A Hypothetical Bottleneck in the Plant Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 9.
- O’Callaghan, M. (2016). Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 5729–5746.
- Pandey, S.S., Patnana, P.K., Rai, R., and Chatterjee, S. (2017). Xanthoferrin, the  $\alpha$  - hydroxycarboxylate-type siderophore of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* , is required for optimum virulence and growth inside cabbage: Siderophore in *Xanthomonas campestris* virulence. *Molecular Plant Pathology* 18, 949–962.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A., and Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 14, 417–419.
- Piper, K.R., Bodman, S.B. von, Hwang, I., and Farrand, S.K. (1999). Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Molecular Microbiology* 32, 1077–1089.

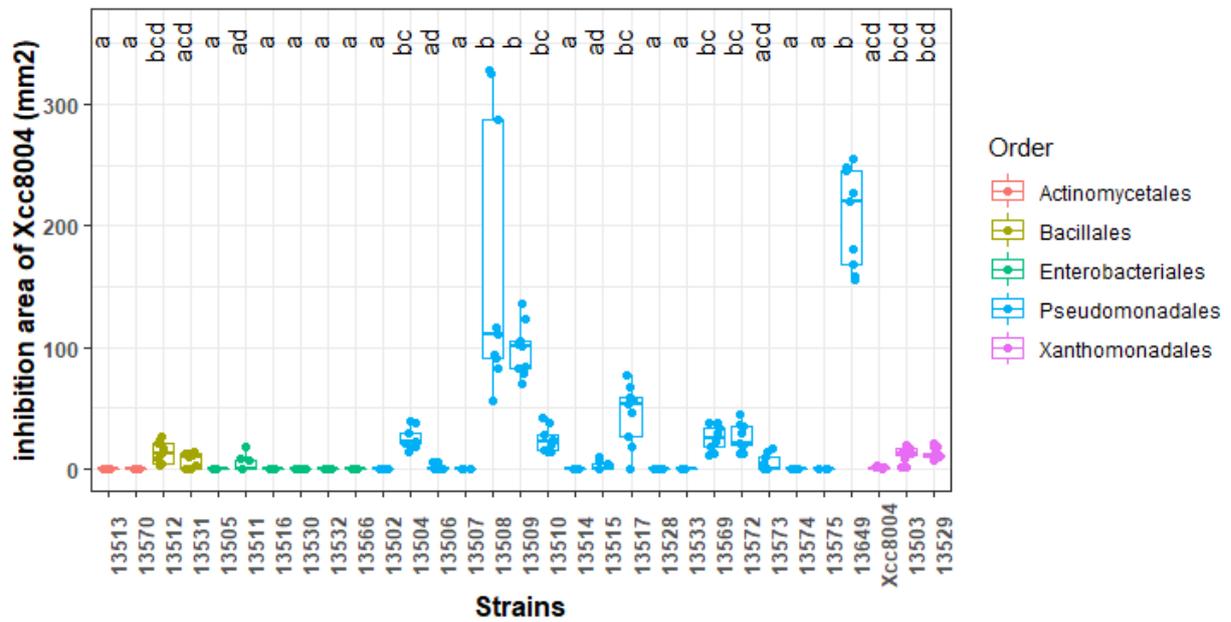


- Pochon, S., Terrasson, E., Guillemette, T., Iacomi-Vasilescu, B., Georgeault, S., Juchaux, M., Berruyer, R., Debeaujon, I., Simoneau, P., and Campion, C. (2012). The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant Methods* 8, 16.
- Price, M.N., and Arkin, A.P. PaperBLAST: Text Mining Papers for Information about Homologs. *MSystems* 2, e00039-17.
- Randhawa, P.S., and Schaad, N.W. (1984). Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. 268–272.
- Reitz, Z.L., Hardy, C.D., Suk, J., Bouvet, J., and Butler, A. (2019). Genomic analysis of siderophore  $\beta$ -hydroxylases reveals divergent stereocontrol and expands the condensation domain family. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 19805–19814.
- 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 and Soil* 422, 67–79.
- Ribeiro, C.M.C., Souza, G.R. de, Schurt, D.A., and Halfeld-Vieira, B. de A. (2017). Pyoverdine use for the control of passion fruit bacterial blight. *Pesq. Agropec. Bras.* 52, 956–959.
- Ringel, M.T., and Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microb Cell* 5, 424–437.
- Roberts, S.J., Hiltunen, L.H., Hunter, P.J., and Brough, J. (1999). Transmission from Seed to Seedling and Secondary Spread of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in Brassica Transplants: Effects of Dose and Watering Regime. *European Journal of Plant Pathology* 105, 879–889.
- Simonin, M., Briand, M., Chesneau, G., Rochefort, A., Marais, C., Sarniguet, A., and Barret, M. (2021). Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *BioRxiv* 2021.06.08.447541.
- Thomma, B.P.H.J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4, 225–236.



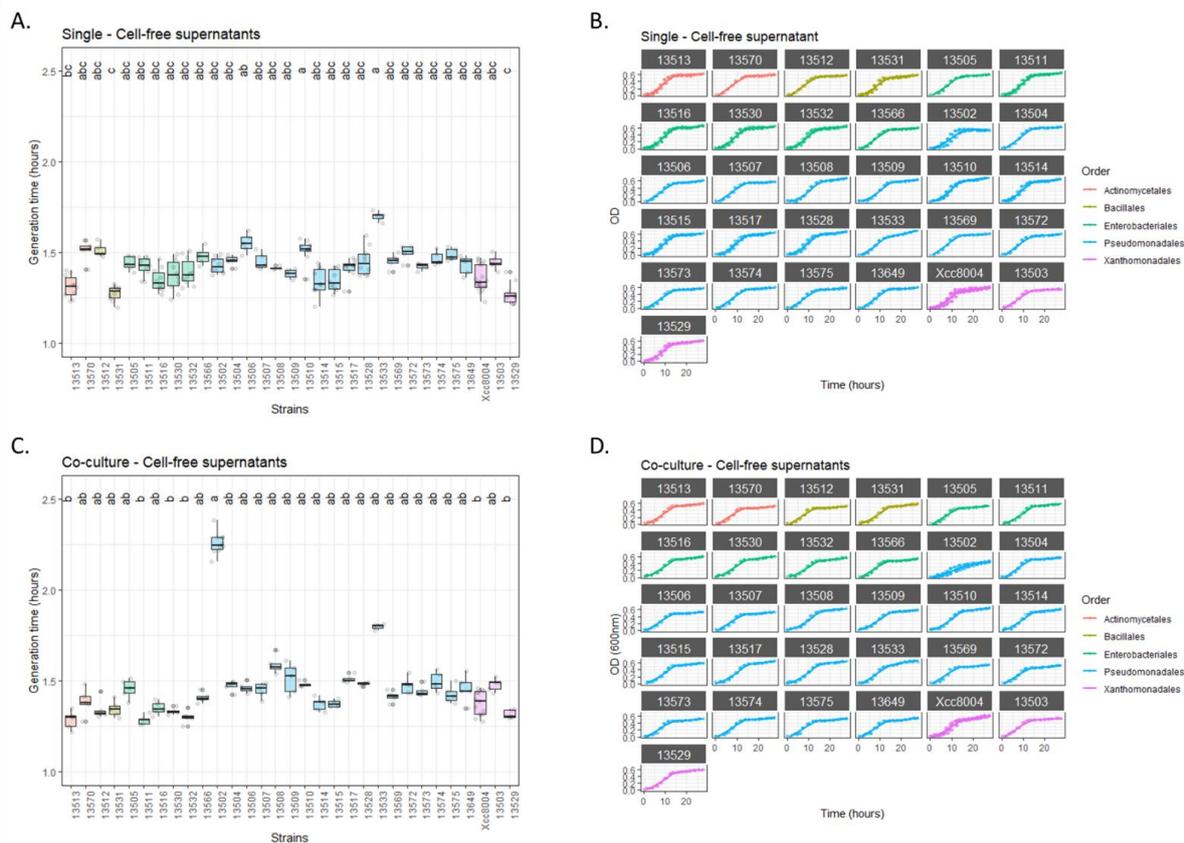
- Torres-Cortés, G. (2018). Functional Microbial Features Driving Community Assembly During Seed Germination and Emergence. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Torres-Cortés, G., Garcia, B.J., Compant, S., Rezki, S., Jones, P., Préveaux, A., Briand, M., Roulet, A., Bouchez, O., Jacobson, D., *et al.* (2019). Differences in resource use lead to coexistence of seed-transmitted microbial populations. *Sci Rep* 9, 6648.
- Turner, P., Barber, C., and Daniels, M. (1984). Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Gen Genet* 195, 101–107.
- Veyrier, F.J., Boneca, I.G., Cellier, M.F., and Taha, M.-K. (2011). A Novel Metal Transporter Mediating Manganese Export (MntX) Regulates the Mn to Fe Intracellular Ratio and *Neisseria meningitidis* Virulence. *PLoS Pathog* 7, e1002261.
- Vicente, J.G., and Holub, E.B. (2013). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol Plant Pathol* 14, 2–18.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology* 15, 22–30.
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., and Holt, K.E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology* 13, e1005595.
- Williams, P.H. (1980). Black Rot: A Continuing. *Plant Dis.* 64, 736.
- van der Wolf, J., Kastelein, P., da Silva Júnior, T.A.F., Lelis, F.V., and van der Zouwen, P. (2019). Colonization of siliques and seeds of rapid cycling *Brassica oleracea* plants by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after spray-inoculation of flower clusters. *European Journal of Plant Pathology*.





**Figure S1: Inhibition of Xcc8004 through overlay assays.** Bacterial strains are colored according to their taxonomic affiliation (strain codes without “CFBP” on the x-axis). Inhibition areas of Xcc8004 (mm<sup>2</sup>) were monitored in three independent replicates. Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn-test were performed to compare inhibition areas at a *p-value* = 0.01.





**Figure S2: Inhibition of Xcc8004 growth following supplementation with CFSs.** Xcc8004 growth was monitored in TSB10 medium supplemented with cell-free supernatants (CFSs) from each of the individual 30 bacterial strains (**A and B**) or from co-cultures of Xcc8004 and individual bacterial strains (**C and D**). Bacterial strains are colored according to their taxonomic affiliation. Five independent replicates were performed for each CFS tested. **A and C.** Generation time (hours) of Xcc8004. Kruskal-Wallis followed by post-hoc were performed to compare Xcc8004 generation times at a  $p$ -value = 0.01. **B and D.** Growth curves of Xcc8004 in TSB10 supplemented with the various CFSs. Strain codes were indicated without “CFBP” on the x-axis (**A, C**) and on the panels (**B, D**).



**Table S1 : Differentially expressed genes of CFBP13502.** Comparison of CFBP13502 transcriptome profiles was performed during co-cultures with (i) strains that produced a CFS with inhibitory activity and (ii) strains that did not trigger CFS with inhibitory activity. Only differentially expressed genes at a  $P < 0.01$  and  $\log_2FC > |2|$  are displayed.

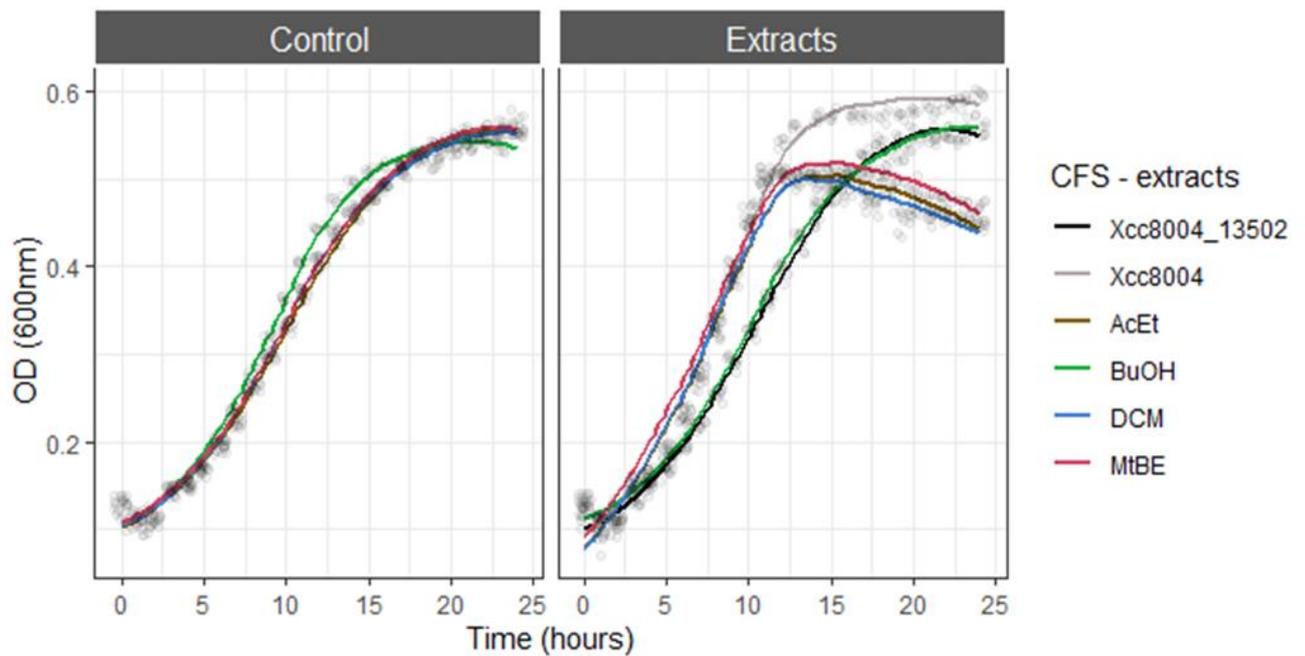
Locus tag	log <sub>2</sub> FC (P < 0.01)	Gene	Predicted function	Pathway	HuC binding site	RocR regulon
DNCP1350_00134	-2.2	prnB	NAD(P) transhydrogenase, beta subunit, PrnB	-	-	yes
DNCP1350_00135	-2.2	prnAB	putative NAD(P) transhydrogenase subunit alpha part 2, PrnAB	-	-	yes
DNCP1350_00136	-2.1	prnAA	putative NAD(P) transhydrogenase, subunit alpha part 1, PrnAA	-	-	yes
DNCP1350_00219	-4.4	hufI	2,3-bisphosphoglycerate dehydrogenase	2,3-bisphosphoglycerate catabolism	-	-
DNCP1350_00312	2.2	orfT	TorB-dependent siderophore receptor	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_00384	4.2	hufF	Formiminotransferaseiminohydrolase, HufF	Histidine catabolism	yes	-
DNCP1350_00388	7.4	hufJ	lincocaine, HufJ	Histidine catabolism	yes	-
DNCP1350_00389	7.5	orfT	ABC transport - membrane protein, OrfT	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_00390	6.7	orfA	ABC transporter - periplasmic substrate-binding component, OrfA	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00391	3.2	orfB	ABC transporter - permease component, OrfB	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00392	3.6	orfC	ABC transporter - ATPase component, OrfC	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00393	3.7	orfH	OrfH/OrfI of HufH, OrfH	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00394	4.3	hufH	Histidine, HufH	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00395	4.1	hufT	Histidine permease, HufT	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00396	3.9	hufI	imidocroton propionate hydrolase, HufI	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00397	3.8	hufG	N-formylglutamate deformylase, HufG	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_00492	2.8	putP	Sodium/proline symporter PutP	-	-	-
DNCP1350_00522	2.6	orfT	TorB-dependent siderophore receptor	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_00684	2.8	kdgD	5-keto-4-deoxyglucuronate dehydrogenase	Glucuronate catabolism	yes	-
DNCP1350_00685	2.1	orfT	Ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase	Glucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_00686	4.9	fumA	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_00687	5.0	fumC	Fumarate hydratase, FumC	-	-	-
DNCP1350_00688	4.9	orfX	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_00689	4.5	sodA	Superoxide dismutase, SodA	-	-	-
DNCP1350_00690	2.9	orfT	Putative heavy-metal transporter	-	-	-
DNCP1350_00691	3.1	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_01045	2.8	facR	Anti-sigma factor, FacR	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_01046	2.8	facI	ECF Sigma factor, FacI	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_01047	2.0	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_01324	-2.2	orfT	Protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha	-	-	-
DNCP1350_01721	-2.2	betX	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system	Glycine betaine catabolism	-	-
DNCP1350_02021	-3.4	orfT	hypothetical protein	-	-	yes
DNCP1350_02022	-3.1	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_02264	2.2	femI	ECF Sigma factor, FemI	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_02267	2.3	orfT	TorB-dependent siderophore receptor	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_02348	-3.9	orfT	Fatty acid desaturase family protein	-	-	-
DNCP1350_02349	-3.9	orfT	Residue domain-containing protein	-	-	-
DNCP1350_02350	-4.1	orfT	FAD-dependent oxidoreductase	-	-	-
DNCP1350_02351	-3.7	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_02402	-2.1	orfT	ABC transporter permease	-	-	-
DNCP1350_02459	-4.9	acoA	Acetoin dehydrogenase alpha subunit, AcoA	2,3-butanediol catabolism	-	-
DNCP1350_02460	-4.7	acoB	Acetoin dehydrogenase beta subunit, AcoB	2,3-butanediol catabolism	-	-
DNCP1350_02461	-4.3	acoC	Acetoin dehydrogenase, dityrosylpiperidine acetyltransferase component, AcoC	2,3-butanediol catabolism	-	-
DNCP1350_02560	4.7	kglD	probable 2-hydroxyacid dehydrogenase, KglD	2-ketoglucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_02581	4.6	kglT	probable 2-ketoglucuronate transporter, KglT	2-ketoglucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_02582	5.0	kglK	probable 2-ketoglucuronate kinase, KglK	2-ketoglucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_02583	5.2	kglE	hypothetical protein, KglE	2-ketoglucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_02584	3.5	pxsS	Transcriptional regulator, PxsS	2-ketoglucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_02711	-2.5	orfT	DNA-binding response regulator, LuxR family	-	-	-
DNCP1350_02712	-2.9	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_02713	-2.5	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_02763	2.6	orfT	Major facilitator family transporter	-	-	-
DNCP1350_02816	-3.2	catA	Catechol 1,2-dioxygenase, CatA	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_02817	-2.5	catC	Muconolactone isomerase, CatC	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_02818	-2.9	catB	Muconate cyclisomerase, CatB	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_02994	-2.2	orfT	tRNA-Cys(tac)	-	-	-
DNCP1350_02995	4.0	orfT	hypothetical protein	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_03021	4.1	orfT	TorB-dependent siderophore receptor	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_03022	3.4	orfT	TorB-dependent siderophore receptor	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_03090	2.5	orfT	2-Keto-D-Glucose Dehydrogenase	2-ketoglucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_03192	2.1	orfT	DNA-binding transcriptional regulator, ICR family	-	-	-
DNCP1350_03193	2.4	rdhA	Reactive intermediate/imine deaminase A	-	-	-
DNCP1350_03194	2.7	orfT	ABC transporter for D-Glucosamine, ATPase component	D-Glucosamine catabolism	-	-
DNCP1350_03195	3.4	orfT	ABC transporter for D-Glucosamine, permease component	D-Glucosamine catabolism	-	-
DNCP1350_03196	3.5	orfT	ABC transporter for D-Glucosamine, permease component	D-Glucosamine catabolism	-	-
DNCP1350_03197	3.4	orfT	ABC transporter for D-Glucosamine, periplasmic substrate-binding component	D-Glucosamine catabolism	-	-
DNCP1350_03303	-2.7	meIE	S-methyltetrahydrodiploxytryptophan-homocysteine methyltransferase, meIE	-	-	-
DNCP1350_03338	-2.2	orfT	DUF4137 domain-containing protein	-	-	-
DNCP1350_03345	-2.8	gplV	ABC transporter for GlyceroL periplasmic substrate-binding component	Glycerol transport	-	-
DNCP1350_03346	-2.7	orfT	DUF2160 domain-containing protein	Glycerol transport	-	-
DNCP1350_03347	-2.6	gplQ	ABC transporter for Glycerol, permease component 2	Glycerol transport	-	-
DNCP1350_03348	-2.7	gplP	ABC transporter for Glycerol, permease component 1	Glycerol transport	-	-
DNCP1350_03349	-2.6	gplT	ABC transporter for Glycerol, ATPase component 2	Glycerol transport	-	-
DNCP1350_03350	-2.8	gplR	ABC transporter for Glycerol, ATPase component 1	Glycerol transport	-	-
DNCP1350_03357	2.5	thpF	Sulfhydryl-iron reductase, ThpF	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_03358	4.1	pvxA_1	Lysine N(6)-hydroxylase/L-ornithine N(5)-oxygenase family protein, PvxA	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03359	4.1	orfT	Phenylacetyl synthase	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03360	4.2	nrpS	NRPS	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03361	4.0	nrpS	NRPS	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03362	4.0	nrpS	NRPS	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03363	4.1	nrpS	NRPS	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03364	3.9	orfT	App hydroxylase	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03365	3.8	pvxG	Thioesterase, PvxG	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03366	3.7	pvxE	ABC transporter ATP binding protein, PvxE	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03369	3.3	pvxF2	Acetyltransferase, PvxF2	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03370	2.8	pvxA	TorB-dependent siderophore receptor, fempyoverdine (FPvA)	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03462	-3.1	acoA	isocitrate lyase	-	-	yes
DNCP1350_03586	2.3	odpF	Glucuronate-selective porin, odpF	Glucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_03587	2.2	orfT	Lironate dehydrogenase	Glucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_03589	-2.9	ppgA	Coenzyme PQQ synthetase protein A, PpgA	-	-	-
DNCP1350_03600	-2.1	pedI	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase, PedI	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03601	-2.5	pedH	Quinoprotein ethanol dehydrogenase, PedH	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03602	-2.4	orfT	MBL fold metallo-hydrolase	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03603	2.6	orfT	Quinoprotein dehydrogenase-associated SoxV2-like carrier	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03604	-2.6	pedG	Bacterial extracellular solute-binding proteins, family 3	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03605	-3.0	pedF	Cytochrome c-type protein	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03606	-2.3	pedR2	DNA-binding response regulator, PedR2	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03609	-2.7	pedS2	Sensor histidine kinase, PedS2	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03610	-2.7	pedA1	ABC transporter substrate-binding protein, PedA1	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03611	-2.5	pedA2	VTYH family beta-propeller repeat protein, PedA2	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03612	-2.4	pedB	ATP-binding cassette domain-containing protein, PedB	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03613	-2.9	pedC	ABC transporter permease, PedC	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03616	-2.2	pedS1	Sensor histidine kinase, PedS1	2-phenylethanol catabolism	-	-
DNCP1350_03617	-3.0	nosP	Nitric oxide sensing protein, NosP	-	-	-
DNCP1350_03621	2.4	orfT	Anti-sigma family transcriptional regulator	-	-	-
DNCP1350_03622	2.1	orfT	MBL fold metallo-hydrolase	-	-	-
DNCP1350_03638	2.4	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_03639	4.4	pvxA_2	L-ornithine N(5)-methyltransferase, PvxA	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03733	2.0	ansB	Glutamine-asparaginase, AnsB	Histidine catabolism	-	-
DNCP1350_03789	2.2	sarI	Succinate semialdehyde dehydrogenase	-	-	-
DNCP1350_03930	3.5	orfT	MFS transporter	-	-	-
DNCP1350_03840	3.2	glucD	D-gucarate dehydratase, GlucD	Glucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_03923	4.1	mbfH	Mbfl family protein	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_03933	3.6	pvxS	Iron regulated transcription activating factor, PvxS	Iron metabolism - pyoverdine	-	-
DNCP1350_04337	2.2	orfT	DUF2025 family protein	-	-	-
DNCP1350_04357	3.1	gntK	Glucosyltransferase, GntK	Glucuronate catabolism	-	-
DNCP1350_04362	-3.9	lysE	Lysine exporter, LysE	-	-	-
DNCP1350_04429	2.5	ocpH_1	Glycine cleavage system protein H, OcpH	-	-	-
DNCP1350_04516	2.9	orfT	ECF Sigma factor	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_04518	3.8	orfT	TorB-dependent transducers	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_04519	3.4	hemO	Heme oxygenase, HemO	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_04584	3.4	treA	Trehalose-6-phosphate hydrolase, TreA	Trehalose	-	-
DNCP1350_04585	3.5	treP	PTS system trehalose-specific EIBC component, TreP	Trehalose	-	-
DNCP1350_04688	3.2	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_04704	-3.0	catA	Catechol 1,2-dioxygenase, CatA	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_04705	-2.0	catC	Muconolactone isomerase, CatC	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_04706	-2.8	catB	Muconate cyclisomerase, CatB	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_04708	-2.0	ansR	Anti-sigma family transcriptional regulator, AnsR	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_04709	-2.9	ansA	Anthraniolate 1,2-dioxygenase, AnsA	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_04710	-2.8	ansB	Anthraniolate 1,2-dioxygenase, AnsB	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_04711	3.2	ancC	Electron transfer component of the anthranilate 1,2-dioxygenase system, AncC	Anthraniolate catabolism	-	-
DNCP1350_05155	2.1	fulF	ECF Sigma factor, FulF	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_05156	2.9	fulR	Anti-sigma factor, FulR	Iron metabolism	-	-
DNCP1350_05174	-2.2	glaA	Betae hydroxymethyltransferase, GlaA	-	-	-
DNCP1350_05188	-2.4	gbcA	Aromatic ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha, GbcA	Glycine betaine catabolism	-	-
DNCP1350_05193	-2.8	orfT	Probable electron transfer flavoprotein beta subunit	Glycine betaine catabolism	-	-
DNCP1350_05194	-3.1	orfT	Probable electron transfer flavoprotein alpha subunit	Glycine betaine catabolism	-	-
DNCP1350_05195	-3.2	dgcB	Dimethylglycine demethylase subunit B, DgcB	Glycine betaine catabolism	-	-
DNCP1350_05196	-3.2	dgcA	Dimethylglycine demethylase subunit A, DgcA	Glycine betaine catabolism	-	-
DNCP1350_05197	-3.1	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_05198	-2.4	orfT	M19 family dehydratase	-	-	-
DNCP1350_05233	2.6	orfT	Lyase, putative	-	-	-
DNCP1350_05263	-2.4	dgcC	Periplasmic solute binding protein, DgcC	-	-	-
DNCP1350_05264	-2.9	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_05265	-2.7	orfT	D-amino acid dehydrogenase	-	-	-
DNCP1350_05341	-2.1	pchP	phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase, PchP	Glycine betaine catabolism	-	-
DNCP1350_05404	-2.9	orfT	hypothetical protein	-	-	-
DNCP1350_05665	2.2	orfT	ECF Sigma factor	Iron metabolism	-	-



**Table S2 : Distribution of a potential pyoverdine synthesis gene cluster of CFBP13502 within *Pseudomonas* strains.** The genetic cluster of strains noted as selected are displayed in Table 3.

Biosample	Group	Species	Strain	Habitat	Host	Contigs	Selected
SAMN09044009	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CFBP13502	Seed	Raphanus sativus	1	yes
SAMN02470777	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WH6	Rhizosphere	wheat	1	yes
SAMN02469436	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas</i>	Lz4W	Soil	NA	1	yes
SAMN04371283	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas fragi</i>	P121	Sediment of Arctic	NA	1	yes
SAMN04076495	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas versuta</i>	L10.10	Soil	NA	1	yes
SAMN05216510	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	LMG 28558	Gallery of bark beetle	<i>Hylesinus fraxini</i>	2	yes
SAMN04151648	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	Leaf129	Leaf	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13	yes
SAMN16237070	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	CFBP13615	Seed	<i>Phaseolus vulgaris</i>	25	yes
SAMN05589722	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas</i>	G2Y	Rhizosphere	<i>Lolium perenne</i>	29	yes
SAMN11658302	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas</i>	9.1	Baltic Sea sediments	NA	30	yes
SAMN10617661	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas</i>	PAMC 29040	Tundra soil	NA	33	yes
SAMN16237901	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	CFBP13575	Seed	<i>Raphanus sativus</i>	34	yes
SAMN03853640	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	RIT-PI-a	Leaf	<i>Toxicodendron radicans</i>	35	yes
SAMN05589716	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas</i>	AH4	Rhizosphere	<i>Poa</i>	40	yes
SAMN05589723	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas</i>	A3422A	Rhizosphere	unknown	43	no
SAMN16237062	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	CFBP13599	Seed	<i>Phaseolus vulgaris</i>	47	yes
SAMN05589718	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas</i>	TDH40	Rhizosphere	<i>Poa</i>	57	no
SAMN07459808	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas fragi</i>	F1815	Stored beef	NA	66	no
SAMN06011243	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas versuta</i>	A4R1.5	Soil	NA	79	no
SAMN06011244	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas versuta</i>	A4R1.12	Soil	NA	101	no
SAMN16411057	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas veronii</i>	IB04	Wastewater	NA	109	no
SAMN14311042	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas typographi</i>	C2L11	Beetle	<i>Ips typographus</i>	153	no
SAMN14311043	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas typographi</i>	C2L12B	Beetle	<i>Ips typographus</i>	165	no
SAMN14311041	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas typographi</i>	CA3A	Beetle	<i>Ips typographus</i>	209	no
SAMN17975962	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas</i>	MAFF 301381	Leaf	Lettuce	223	no
SAMN17975957	P. fluorescens subgroup	<i>Pseudomonas</i>	MAFF 301380	Leaf	Lettuce	268	no
SAMN13831439	P. fragi subgroup	<i>Pseudomonas</i>	F14BN2	Water	NA	688	no
SAMN04092564	P. rhizosphaerae subgroup	<i>Pseudomonas coleopterorum</i>	ABAC63	Fruit	kiwi fruit	3451	no





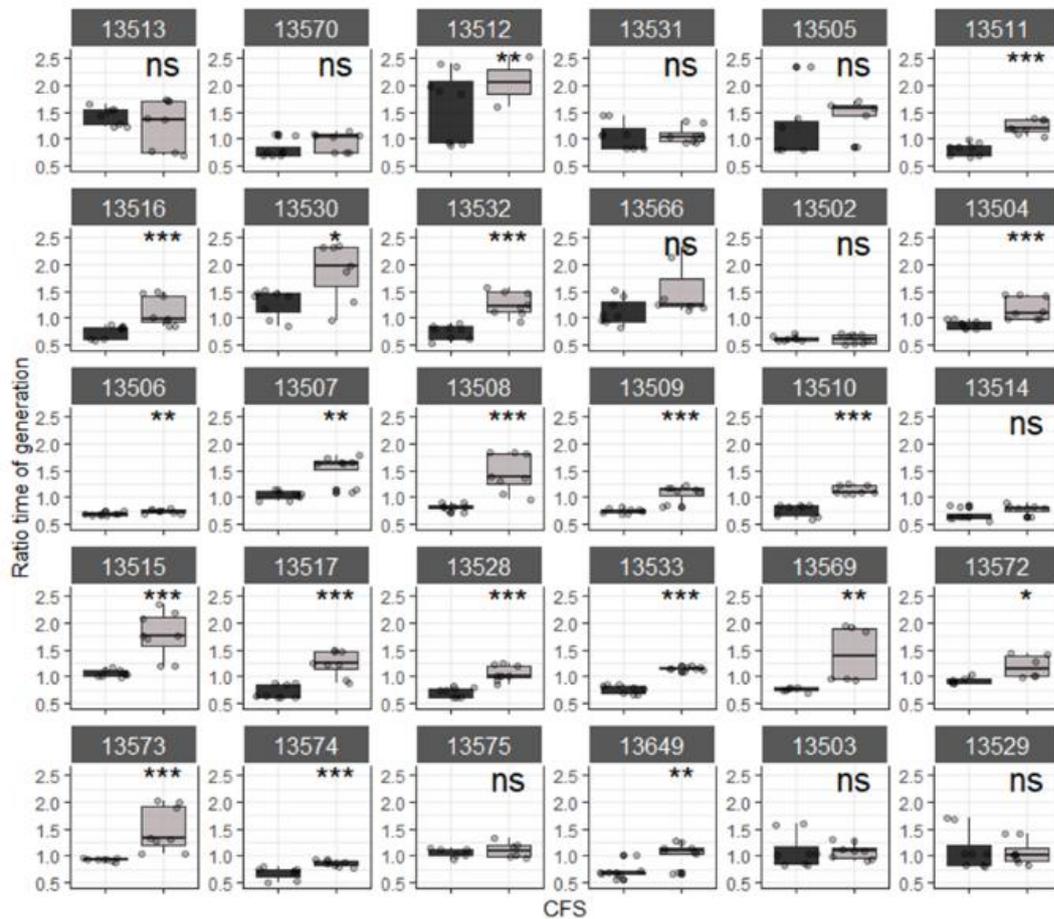
**Figure S4 : BuOH-extracted fraction decreased the growth rate of Xcc8004. A.** Xcc8004 growth was monitored in TSB10 supplemented with fractions AcEt (brown), BuOH (green), DCM (blue) and MtBE (red) obtained from CFS of Xcc8004 and CFBP13502. Growth of Xcc8004 was compared to solvents only (panel control). As control we measured Xcc8004 growth in Xcc8004 CFS (grey) and Xcc8004+13502 CFS (black).



**Table S3: Candidate compounds detected in Xcc8004 + CFBP13502 CFS. Bold rows are compounds detected with positive and negative ionization modes.**

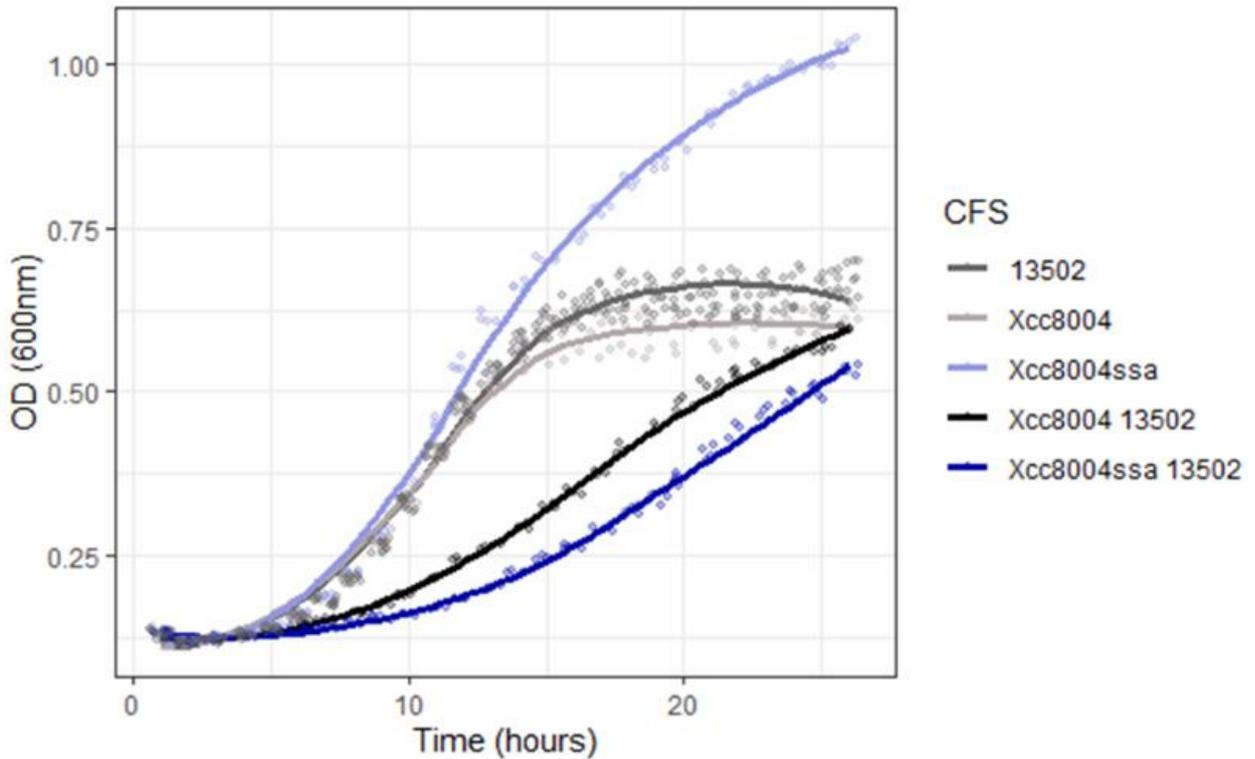
Retention time (min)	Neutral mass (Da)	m/z	Charge	Anova (p)	Max Fold Change	Highest Mean	Lowest Mean	Maximum Abundance	CV%	Ionization mode
12.01	519.3 ?	520.3324	1	2.71E-13	14	Xcc8004+CFBP13502 CFBP13502	CFBP13502	54535	10.19	Positive
12.56	563.3 ?	564.3587	1	5.37E-11	17	Xcc8004+CFBP13502 CFBP13502	CFBP13502	73821	13.33	Positive
13.05	607.3779	608.3849	1	1.52E-12	17	Xcc8004+CFBP13502 CFBP13502	CFBP13502	82242	14.54	Positive
13.50	651.4039	652.4108	1	0	18	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	72775	6.62	Positive
13.97	695.4308	696.4373	1	1.11E-16	23	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	53510	8.93	Positive
<b>23.90</b>	-	<b>531.2262</b>	<b>2</b>	<b>1.89E-10</b>	<b>9</b>	<b>Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004</b>	<b>Xcc8004</b>	<b>92447</b>	<b>4.1</b>	<b>Positive</b>
<b>24.45</b>	<b>1080.3968</b>	<b>1081.4041</b>	<b>1</b>	<b>1.12E-12</b>	<b>39</b>	<b>Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004</b>	<b>Xcc8004</b>	<b>55350</b>	<b>10.93</b>	<b>Positive</b>
19.23	1004.3757	1003.3755	1	6.38E-10	15	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	47952	6.14	Negative
20.56	1024.3332	1023.3333	1	0	22	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	43040	3.32	Negative
22.60	1032.4079	515.1967	2	6.83E-11	17	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	162487	4.81	Negative
22.98	1120.3378	1119.3455	1	1.26E-10	6	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	55590	5.83	Negative
23.08	1052.3659	1051.3647	1	0	26	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	152691	3.93	Negative
23.22	-	1057.4203	1	5.68E-12	19	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	111307	9.66	Negative
23.34	-	542.6859	2	4.60E-12	6	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	92530	3.6	Negative
23.58	1122.3537	1121.3525	1	2.45E-9	11	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	281251	3.85	Negative
23.70	-	538.1841	2	0	35	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	75823	5.37	Negative
<b>23.90</b>	<b>1060.4383</b>	<b>529.2119</b>	<b>2</b>	<b>5.25E-13</b>	<b>24</b>	<b>Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004</b>	<b>Xcc8004</b>	<b>1515712</b>	<b>6.87</b>	<b>Negative</b>
24.41	0	562.1928	2	6.66E-14	28	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	116101	6.6	Negative
<b>24.41</b>	<b>1080.3966</b>	<b>1079.3938</b>	<b>1</b>	<b>6.08E-14</b>	<b>24</b>	<b>Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004</b>	<b>Xcc8004</b>	<b>746236</b>	<b>3.25</b>	<b>Negative</b>
24.57	-	542.2193	2	4.76E-11	18	Xcc8004+CFBP13502 Xcc8004	Xcc8004	39336	12.82	Negative





**Figure S5 : Xcc8004+CFBP13502 CFS inhibited a wide range of bacterial taxa.** The growth of 30 bacterial strains (strain codes without “CFBP” indicated above panels) were measured during 24 hours in TSB10% supplemented with CFBP13502 CFS (control, grey) or CFBP13502+Xcc8004 CFS (black), using a spectrophotometer. Three independent replicates of three technical replicates were performed for each condition. Wilcoxon-tests were performed to compare the growth of each strain in CFBP13502 CFS versus CFBP13502+Xcc8004 CFS ( $P < 0.05^*$ ,  $P < 0.01^{**}$ ,  $P < 0.001^{***}$ ).





**Figure S6: Xanthoferrin deficient mutant triggered production of the CFBP13502 metabolites.** Xcc8004 growth was monitored in TSB10 supplemented with CFSs of CFBP13502 (13502, dark grey), Xcc8004 (light grey) and Xcc8004  $\Delta$ xssA (light blue), a strain impaired in xanthoferrin production. CFSs of co-culture of CFBP13502 with either Xcc8004 (black) or Xcc8004  $\Delta$ xssA (dark blue) were also added to TSB10.



### III. Conclusion

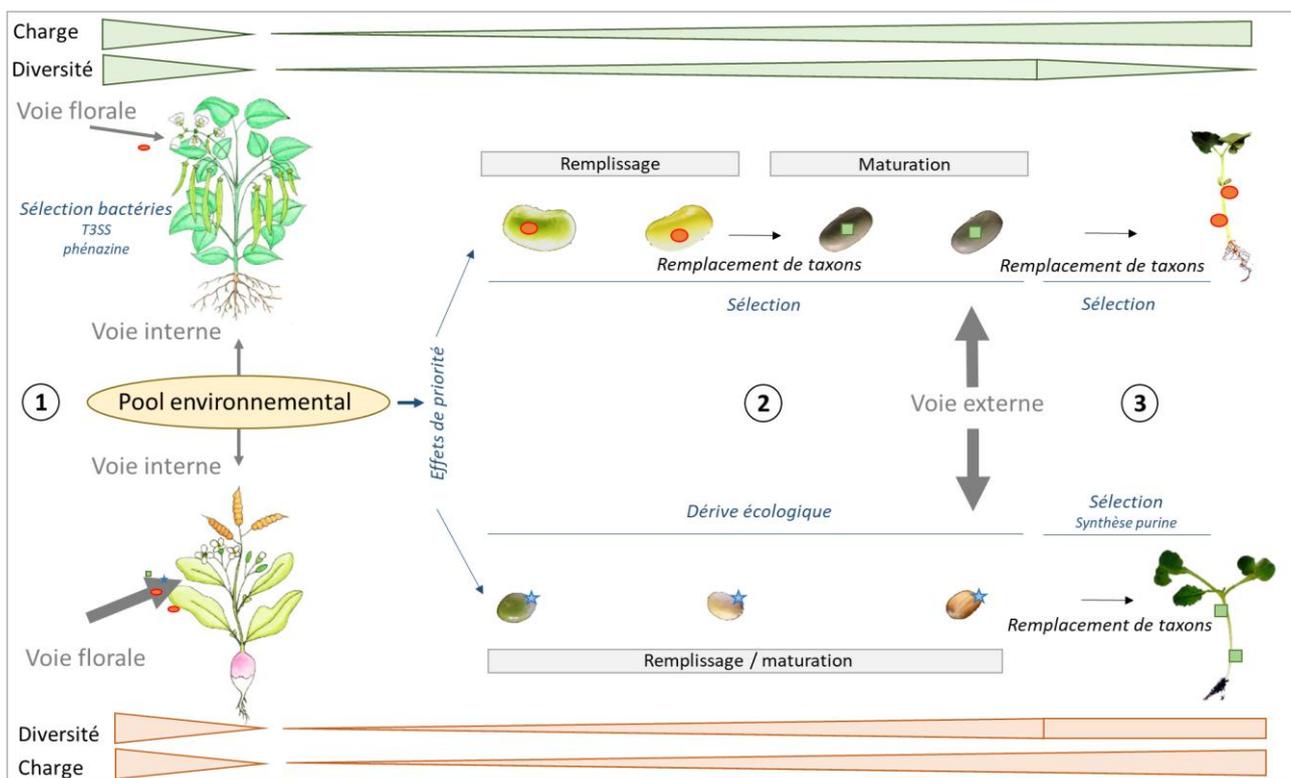
Dans ce chapitre nous avons identifié plusieurs souches du microbiote des graines de radis possédant une activité inhibitrice de croissance de la souche *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc8004). Parmi ces bactéries, la souche *P. fluorescens* CFBP13502 produit un composé qui augmente le temps de génération de Xcc8004 par un facteur 1,4. Ce composé est un sidérophore apparenté aux pyoverdines qui limite la disponibilité du fer dans le milieu extracellulaire en le chélatant. Les données préliminaires de génomique et métabolomique semblent indiquer que cette pyoverdine ne possède pas le groupement dihydroxyquinoline impliqué dans la chélation du fer et la fluorescence des bactéries. Comprendre comment cette pyoverdine atypique est capable de chélater le fer nécessite de plus amples études de caractérisation de sa structure. Cette étape sera réalisée après obtention d'un mutant affecté dans la synthèse de cette pyoverdine atypique.

De manière intéressante, la production de ce composé est induite lors de la confrontation entre la souche productrice CFBP13502 et certaines souches du microbiote des graines, telles que, Xcc8004, *Stenotrophomonas rhizophila* et *Bacillus simplex*. Le signal déclenchant l'induction de la pyoverdine atypique par CFBP13502 dans les cocultures doit être précisé. Une hypothèse de travail est basée sur la modulation du ratio histidine/urocanate dans le milieu extracellulaire. En effet, en présence d'une concentration importante en urocanate, le régulateur transcriptionnel HutC est réprimé chez CFBP13502 ce qui peut induire en conséquence la synthèse de la pyoverdine atypique. Le dosage de ces métabolites dans le milieu extracellulaire doit à présent être réalisé afin de valider ou non cette hypothèse.

Enfin d'un point de vue écologique, ce travail est un bon exemple illustratif de la complexité des interactions entre micro-organismes. En effet les souches inductrices de la production de la pyoverdine atypique chez CFBP13502 sont résistantes à la présence de cette dernière dans le milieu de culture, à l'exception de Xcc8004. Cette résistance est probablement due à la capacité de transport de la pyoverdine atypique par ces souches. D'un point de vue pratique, l'introduction de *P. fluorescens* CFBP13502 dans les semences dans le but de lutter contre l'agent phytopathogène Xcc8004, n'induirait l'excrétion du composé antimicrobien qu'en présence d'un nombre restreint de souches dont l'agent pathogène Xcc8004. Cette spécificité est intéressante car elle permet de réduire l'impact de l'agent microbien sur le microbiote indigène de la plante ainsi que sur l'environnement.



# DISCUSSION / PERSPECTIVES



**Figure 1 : Principaux résultats portant sur l'assemblage du microbiote des graines, révélés dans ces travaux de thèse. 1. Colonisation primaire des graines.** Un goulot d'étranglement en terme de diversité et de charge bactérienne est observé chez la graine, avec la dominance d'un unique taxa par graine. Le pool environnemental permet la transmission par la voie interne de micro-organismes aux semences. Il va aussi permettre la transmission de micro-organismes par la voie la voie florale chez le radis, alors que cette voie de transmission florale va être très faible pour le haricot. **2. Succession des ensembles microbiens pendant le développement de la graine.** Les effets de priorité semblent importants dans la constitution du microbiote, au vu de l'abondance d'un seul et unique taxon, de taxonomie très variable au sein de chaque graine individuelle. Chez le haricot, dépendamment du pool environnemental de micro-organismes il peut y avoir un remplacement dans les communautés bactériennes entre le remplissage et la maturation des graines et d'importants processus de sélection du microbiote. Ce remplacement n'est pas observé chez le radis qui est lui soumis principalement à des processus de dérive. **3. Colonisation tardive des micro-organismes et devenir sur les plantules.** La graine au stade mature va être colonisée par des taxons par la voie externe et va ainsi augmenter la diversité bactérienne associée aux graines. Enfin, il va y avoir une importante sélection des taxons de la graine à la plantule, avec des taxons initialement rares sur la graine qui vont émerger sur la plantule. Les étoiles bleues, les ronds rouges et les carrés verts, correspondent à des micro-organismes d'affiliations taxonomiques différentes.

La graine est un modèle intéressant pour étudier la colonisation d'un nouvel habitat par des populations de micro-organismes (Shade, Jacques and Barret 2017). Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'assemblage du microbiote pendant le développement de la graine (Mano *et al.* 2006; Liu *et al.* 2013). Actuellement, aucune donnée n'est disponible quant à la détection de micro-organismes au cours de l'embryogenèse de la graine. Cette colonisation précoce semble pourtant possible, au vu de la transmission verticale de micro-organismes de la mère à la cellule œuf observée chez les animaux (Bright and Bulgheresi 2010). De plus, bien que plus rare, une transmission verticale par les gamètes mâles a également été démontrée chez les insectes et ne peut donc être exclue chez les plantes (Watanabe *et al.* 2014). Ce postulat mériterait cependant d'être validé expérimentalement chez les plantes en collectant des échantillons de graine lors des stades très précoces de développement. Cependant, cet échantillonnage est très difficile à réaliser en routine en raison de la taille des organes et de leur fragilité. Il serait ainsi nécessaire d'utiliser des approches de microdissection au sein du fruit pour pouvoir avoir accès à ce niveau précis d'information. Lors de ces travaux (**chapitres 1 et 2**), nous avons donc débuter notre collecte de données d'observation au cours du stade de remplissage de la graine. En première approximation nous considérons donc ce stade comme état initial de notre habitat graine et les bactéries lui étant associées sont donc considérées comme des organismes pionniers.

### ***Colonisation primaire des graines.***

Notre analyse graine à graine réalisée sur radis et haricot a permis de démontrer que chaque graine est colonisée par un taxon bactérien dominant. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse du symbiote primaire (Newcombe *et al.* 2018) selon laquelle un seul taxon microbien est capable de coloniser l'habitat graine (**Figure 1**). Cependant l'identité de ce taxon dominant bactérien est très variable puisque l'on retrouve plus de 200 ASV *gyrB* distincts chez le haricot et 80 ASV *gyrB* distincts chez le radis (**chapitres 1 & 2**). Cette variation se retrouve chez les graines collectées sur plusieurs plantes mais également au sein de graines récoltées sur une même plante voire d'un même fruit (**chapitre 2**). Ces observations indiquent qu'une large gamme de taxons bactériens est susceptible d'être incorporée au sein de la graine et ouvrent ainsi des perspectives intéressantes de pilotage de la composition du microbiote des graines. Avant de cibler une



stratégie d'inoculation de micro-organismes bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes, il convient d'étudier leurs voies de transmission à la graine.

### ***D'où proviennent ces taxons pionniers ?***

Si trois voies de transmission des micro-organismes aux graines ont été documentées (Maude 1996), seules les voies internes et florales sont impliquées dans la colonisation des graines par les taxons pionniers. Étudier l'importance relative de ces deux voies nécessite de passer par des études de localisation microscopiques pour chaque micro-organisme en utilisant des souches marquées (e.g. Darrasse *et al.*, 2018; Tancos *et al.*, 2013).

Avant de passer à ces approches souches-centrées, une estimation du mode de transmission de l'ensemble des taxons pionniers peut être réalisée en collectant des données d'observations sur des sources d'inoculum potentielles. D'après nos données, il semble que l'importance relative de chaque voie de transmission varie en fonction de l'espèce végétale étudiée. En effet, la co-occurrence d'ASV bactériens au sein des habitats fleur et graine du radis est beaucoup plus importante que celle détectée dans ces mêmes habitats chez le haricot (**chapitres 1 et 2**). Ainsi, une partie des taxons pionniers colonisant les graines de radis est probablement issue de la voie florale, alors que cette dernière ne semble pas être une source d'inoculum potentielle (ou très mineure) pour les graines de haricot (**Figure 1-1**). Ainsi, le mode de pollinisation, allogame pour le radis et autogame pour le haricot, pourrait expliquer cette différence observée dans les voies de colonisation utilisées par les bactéries. Il est reconnu que l'allogamie favorise le brassage de micro-organismes au niveau des fleurs de plusieurs espèces végétales (Vannette 2020). Cette dispersion accentuée de micro-organismes peut notamment influencer la structure taxonomique du microbiote des graines matures de colza (Prado *et al.* 2019). Une inoculation de micro-organismes d'intérêts sur les pièces florales du porte-graine par la technologie EndoSeed™ (Mitter *et al.* 2017) pourrait donc être appropriée pour incorporer ces taxons au sein des graines de radis. En revanche, pour le haricot, il semble que les taxons pionniers soient majoritairement acquis par voie systémique, même si cela reste à être clairement démontré en augmentant l'échantillonnage de tiges de haricot par rapport à celui effectué au cours du **chapitre 2**. Si cette observation est confirmée, l'inoculation des micro-organismes sur le porte-graine pourrait être réalisée par des piqûres dans la tige des plantes ou par la pulvérisation précoce des plantes. La seconde stratégie implique de laisser s'installer une colonisation vasculaire



par ces organismes, si tant est qu'ils puissent naturellement passer le système de défense une fois entrés par les hydathodes. En effet, l'expression massive du T3SS et de ces effecteurs par *Xcc* dans les hydathodes laisse penser qu'un dialogue s'instaure avec la plante, qui permet aux organismes adaptés de court-circuiter les défenses de la plante (Luneau *et al.* 2021).

### **Comment sélectionner les souches à inoculer ?**

Quel que soit la voie de transmission utilisée par ces taxons pionniers, ces derniers sont soumis à une pression de sélection forte lors du stade de remplissage de la graine (**chapitre 2**). En effet, l'accumulation d'amidon ou encore les variations de pression osmotique sont des facteurs de sélection des micro-organismes dans les stades matures de la graine (Mano *et al.* 2006; Liu *et al.* 2013). Il est également fort probable que la plante soit impliquée dans cette sélection en induisant un certain nombre de voies de défense (Terrasson *et al.* 2015) en réponse à la colonisation par ces bactéries. Parmi les 39 souches bactériennes isolées du microbiote des graines de haricot et de radis, 17 (43,6%) possèdent un T3SS (**chapitre 1**). Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études qui ont déjà montré l'importance du T3SS lors de la transmission de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* aux graines de haricot (Darsonval *et al.* 2008). Les effecteurs protéiques sécrétés par ce système pourraient permettre de contourner les défenses de la plante hôte. A titre d'exemple, les souches de *Pseudomonas orientalis* majoritairement détectées au sein des graines de haricot en développement (**chapitre 1**) possèdent un homologue de l'effecteur HopB1 impliqué dans la suppression de l'immunité médiée par BAK1 chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Li *et al.* 2016). Toutefois, d'autres déterminants génétiques doivent également permettre aux bactéries de coloniser les graines de l'hôte sans induire une réponse immunitaire importante. En effet, les souches très abondantes et prévalentes de *Pantoea agglomerans* isolées des graines de radis et haricot (**chapters 1 et 2**) ne contiennent pas de T3SS dans leurs séquences génomiques.

D'après les résultats obtenus dans le **chapitre 4**, la souche isolée de graines de radis (Prado *et al.* 2019) *P. fluorescens* CFBP13502, pourrait être un candidat intéressant à inoculer sur le porte-graine de radis pour limiter l'incidence de la transmission de *Xcc*8004. D'après les données de métabarcoding obtenues avec *gyrB*, l'espèce associée à CFBP13502 est distribuée également sur d'autres graines de *Brassicaceae* comme le colza et le navet (Simonin *et al.* 2021) ainsi que sur fleurs, fruits et graines de radis (Chesneau *et al.*, 2020 – **chapitre 1**). Le séquençage de son génome



a permis d'identifier un T3SS qui lui permettrait de contourner les voies de défense de la plante. Ce dernier point doit cependant être confirmé par l'étude des effecteurs qui lui sont associés. En conclusion, cette souche semble être bien adaptée au microbiote des graines de *Brassicaceae* et de par sa détection importante sur les organes floraux, elle pourrait être efficacement transmissible par la voie florale. Cette hypothèse mériterait d'être évaluée expérimentalement, car l'agent pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) utilise également la voie de transmission florale pour coloniser les graines de chou (van der Wolf, van der Zouwen and van der Heijden 2013; van der Wolf *et al.* 2019). Une exclusion de *Xcc* par CFBP13502 serait donc envisageable et permettrait ainsi de limiter l'incidence de transmission aux semences de cet agent pathogène.

### ***Est-ce que les primo-colonisateurs sont persistants dans les graines matures ?***

Les stratégies d'inoculation des porte-graines avec des inoculums microbiens nécessitent de s'intéresser au devenir des taxons pionniers lors du développement de la graine. Avant de discuter ces résultats, il convient de rappeler une limite de notre dispositif expérimental, à savoir un échantillonnage destructif, qui ne permet pas de suivre la dynamique du microbiote de la graine tout au long de son développement. Ces dispositifs imparfaits permettent tout de même de formuler plusieurs hypothèses qui seront ensuite testées expérimentalement.

D'après les travaux issus des deux premiers chapitres de cette thèse, il semble que le devenir des primo-colonisateurs dépend du modèle de plante étudiée (**Figure 1-2**). Pour le radis, bien que l'identité des taxons pionniers soient plus variables que pour le haricot, il semble que ces taxons persistent lors des différents stades de développement de la graine (**chapitres 1 et 2**). On peut toutefois observer l'incorporation de taxons lors des derniers stades de maturation de la graine qui peuvent devenir dominant au sein de la graine. A ce stade de maturation, la graine va se dissocier du placenta et donc stopper l'apport de micro-organismes par voie interne. Ainsi cette colonisation tardive de ces micro-organismes intervient probablement par voie externe *via* le fruit quand celui-ci devient déhiscent. Cet apport de taxons par voie externe pourrait être validé expérimentalement en comparant la richesse bactérienne associée aux graines de fruits déhiscents ou de mutants présentant une structure de silique non déhiscente (Liljegren *et al.* 2004).



En ce qui concerne le haricot, nous avons observé un remplacement important des primo-colonisateurs affiliés aux *Enterobacterales* par d'autres ordres bactériens (comme les *Micrococcales*, *Sphingomonadales* ou *Burkholderiales*) lors des étapes de remplissage et de maturation de la graine (**chapitre 2**). A la différence des *Brassicaceae*, les changements métaboliques se déroulant lors du remplissage et de la maturation des graines sont beaucoup plus marqués chez les *Fabaceae*. On peut notamment citer des modifications importantes en teneur en eau (Leprince *et al.* 2017) et en contenu en sucres (Weber, Borisjuk and Wobus 2005). Ces changements de ressources et de disponibilité en eau pourraient alors favoriser d'autres taxons plus adaptés à ces conditions (Mano *et al.* 2006). L'arrivée de taxons plus tardifs au sein des graines de haricot interroge également sur leur origine. L'hypothèse la plus plausible serait une arrivée concomitante aux primo-colonisateurs par la voie systémique. Ces taxons persisteraient dans l'habitat graine à une faible taille de population (taxons rares). Les changements de conditions environnementales permettraient ensuite une augmentation de l'abondance de ces taxons dans la graine (Shade *et al.* 2014). La présence de taxons rares dans les deux modèles de plante au cours des phases initiales de remplissage pourrait expliquer l'importance croissante de la dérive écologique au cours de phases plus tardives du développement des graines (**chapitres 1 et 2**, Rezki *et al.*, 2018).

Le remplacement des primo-colonisateurs des graines de haricot n'est cependant pas systématique et dépend de l'identité du taxon associé. Ce remplacement n'avait pas été observé au sein des graines de haricot lors du **chapitre 1**. Dans ce chapitre, un ASV affilié à l'espèce *P. orientalis* était majoritairement retrouvé dans les lots de graines analysés tout au long des phases de remplissage et de maturation. Les souches de *P. orientalis* séquencées possèdent non seulement un T3SS mais également les gènes impliqués dans la biosynthèse de la phenazine. Ce métabolite secondaire joue un rôle important dans la compétition d'interférence, notamment dans l'habitat plante (Chin-A-Woeng, Bloemberg and Lugtenberg 2003). Les compétitions entre micro-organismes se déroulant au sein de la graine sont probablement très fréquentes de par la taille restreinte de cet habitat et de sa faible disponibilité en nutriments.

Cette compétition pour les ressources et l'espace est un second facteur participant à la forte sélection observée au cours des phases de remplissage et de maturation de la graine, en plus de celle exercée par la plante *via* ses réactions de défenses et les modifications en disponibilité en eau et en nutriments. La compétition d'exploitation médiée par la pyoverdine atypique de *P. fluorescens* CFBP13502 vis-à-vis de Xcc8004 est donc intéressante à exploiter pour limiter la



transmission de cet agent pathogène aux graines. En effet, le fer est une ressource limitante dans la graine (Hurrell *et al.* 1992; Lestienne *et al.* 2005), ainsi les micro-organismes peuvent rentrer en compétition pour cette ressource. De plus, l'induction de la production de cette pyoverdine par CFBP13502 est spécifique, car elle nécessite la présence d'un ou plusieurs composés produits par Xcc8004 (**chapitre 4**).

S'il n'est pas encore possible de prédire la structure du microbiote des graines matures en fonction de l'ordre d'arrivée des taxons bactériens, le modèle conceptuel suivant peut toutefois être proposé (**Figure 1**). Le pool environnemental en micro-organismes agit comme une importante source d'inoculum de la graine, dont une grande partie des micro-organismes sera transmise par la voie systémique chez le radis et le haricot et par la voie florale principalement chez le radis (**1**). La succession des ensembles microbiens va être à la fois dépendante du pool environnemental et de l'espèce de plante étudiée. Ainsi, elle va être soumise à d'importants effets de priorité, le premier taxon colonisant la graine, dominant la niche en terme d'abondance. Les processus écologiques seront également variables selon les caractéristiques de la plante (ex : pollinisation) (**2**).

### ***Dynamique du microbiote des graines lors de la germination et la levée.***

Les taxons bactériens associés à la graine ne vont pas forcément se transmettre à la future plantule. Le suivi non-destructif de cette transmission graine-plantule (**chapitre 2**) a clairement démontré ce phénomène. Par ailleurs, cette transmission n'est pas dépendante de l'abondance initiale des taxons bactériens sur la graine (**chapitre 2**). La sélection serait donc le processus écologique le plus important dans la transmission des micro-organismes de la graine à la plantule (**Figure 1-3**). Cette sélection semble toutefois ne pas reposer sur les voies de défenses de la plante hôte (**chapitre 3** ; Darrasse *et al.*, 2010). En revanche la nature et la quantité des exsudats libérés lors de la germination pourraient expliquer cette sélection (Schiltz *et al.* 2015) de micro-organismes copiotrophes (Torres-Cortés 2018).

Si de nombreux métabolites sont exsudés lors de la germination, il semble que les souches transmises aux plantules doivent néanmoins synthétiser un certain nombre de composés ou facteurs permettant l'installation dans cette niche. En analysant les différences de fitness parmi la banque de RB-TnSeq de Xcc8004 (**chapitre 3**) nous avons identifié la voie de biosynthèse des purines comme particulièrement importante pour la transmission de cet agent pathogène aux



plantules. L'implication de cette voie de biosynthèse pour la transmission à la plantule d'autres membres du microbiote doit être à présent étudiée.

La co-inoculation de Xcc8004 avec la souche de *P. fluorescens* CFBP13502 sur graine va induire de nombreuses modifications de fitness des mutants de Xcc8004 sur plantule avec plus de 65 gènes impactés (**chapitre 3**). Cependant, on ne retrouve cependant pas de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme du fer. Si la production de xanthoferrine peut être complémentée au sein de la population de mutants, la présence de transporteurs TonB aurait dû être mise en évidence. Sur la base de ces observations, il semble que la compétition pour le fer soit limitée lors de la transition de la graine à la plantule. Cela expliquerait alors pourquoi la souche *P. fluorescens* CFBP13502 ne réduit pas significativement la taille de population de Xcc8004 sur plantule de radis (résultats non présentés au cours de ce travail de thèse). Ces résultats sont néanmoins en contradiction avec la production de nombreux phyto-sidérophores (e.g. coumarines ou flavines) par la plantule (Jeong *et al.* 2008; Dai *et al.* 2019).

### ***Inoculation post-récolte une autre approche pour moduler la composition du microbiote des graines.***

Comme décrit précédemment, la transmission à la graine de micro-organismes bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes peut être réalisée par inoculation des porte-graines. Cependant, ce processus n'est pas aisément transposable à une grande diversité de micro-organismes. Une alternative fréquemment employée dans le domaine du biocontrôle consiste à réaliser des inoculations des graines après récolte notamment par enrobage (Bashan *et al.* 2014; Qiu *et al.* 2019). Étudier la transmission aux plantules des micro-organismes sélectionnés semble être toutefois un prérequis essentiel puisque l'abondance des taxons sur les graines ne suffit pas à garantir leur transmission à la plantule (**chapitre 2**). La sélection de ces taxons pourrait également être basée dans le futur sur l'analyse de leurs déterminants génétiques nécessaires à leur transmission à la plantule (**chapitre 3**). Cependant, cette étape requiert encore de nombreux travaux sur une diversité de souches bactériennes. Enfin il est également nécessaire d'évaluer l'impact de ces inoculations sur les stades précoces de développement de la plante, notamment la germination et la levée. Par exemple, l'inoculation de souches de *Pantoea agglomerans* sur graines de haricot va induire des malformations au niveau des cotylédons des plantules correspondantes (**chapitre 2**). De futures études sont nécessaires sur ces souches de



*P. agglomerans* du fait de leur impact sur le phénotype des plantules et de leur ubiquité sur les graines. En effet, ces *P. agglomerans* appartiennent à l'ASV le plus abondant et prévalents du microbiote des graines matures toutes espèces de plantes confondues (Simonin *et al.* 2021) et doivent donc posséder d'importants déterminants leur permettant de prospérer sur l'habitat de la graine.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



**-A-**

- Abdelfattah A, Sanzani SM, Wisniewski M *et al.* Revealing Cues for Fungal Interplay in the Plant–Air Interface in Vineyards. *Front Plant Sci* 2019;10, DOI: 10.3389/fpls.2019.00922.
- Abdelfattah A, Wisniewski M, Schena L *et al.* Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environmental Microbiology* 2021;23:2199–214.
- Abdullaeva Y, Ambika Manirajan B, Honermeier B *et al.* Domestication affects the composition, diversity, and co-occurrence of the cereal seed microbiota. *Journal of Advanced Research* 2021;31:75–86.
- Ádám AL, Nagy ZÁ, Kátay G *et al.* Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19:1146.
- Adam E, Bernhart M, Müller H *et al.* The Cucurbita Pepo Seed Microbiome: Genotype-Specific Composition and Implications for Breeding., 2018a:35–49.
- Adam E, Bernhart M, Müller H *et al.* The Cucurbita pepo seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant Soil* 2018b;422:35–49.
- Aizenberg-Gershtein Y, Izhaki I, Halpern M. Do honeybees shape the bacterial community composition in floral nectar? *PLoS One* 2013;8:e67556.
- Albright MBN, Louca S, Winkler DE *et al.* Solutions in microbiome engineering: prioritizing barriers to organism establishment. *ISME J* 2021, DOI: 10.1038/s41396-021-01088-5.
- Aleklett K, Hart M, Shade A. The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. *Botany* 2014;92:253–66.
- Alonso JM, Stepanova AN. The Ethylene Signaling Pathway. *Science* 2004;306:1513–5.
- Ambika Manirajan B, Ratering S, Rusch V *et al.* Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity: The bacterial microbiota of flower pollen. *Environmental Microbiology* 2016;18:5161–74.
- Amend AS, Cobian GM, Laruson AJ *et al.* Phytobiomes are compositionally nested from the ground up. *PeerJ* 2019;7:e6609.
- Anderson MJ. Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Can J Fish Aquat Sci* 2001;58:626–39.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG *et al.* Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 2004;19:535–44.
- Andrews JH, Harris RF. The Ecology and Biogeography of Microorganisms on Plant Surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 2000;38:145–80.



Aschehoug ET, Callaway RM, Newcombe G *et al.* Fungal endophyte increases the allelopathic effects of an invasive forb. *Oecologia* 2014;175:285–91.

Aschehoug ET, Metlen KL, Callaway RM *et al.* Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology* 2012;93:3–8.

### -B-

Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK *et al.* Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* 2018;560:233–7.

Bai Y, Müller DB, Srinivas G *et al.* Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature* 2015;528:364–9.

Bais HP, Weir TL, Perry LG *et al.* The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology* 2006;57:233–66.

Baker KF, Smith SH. Dynamics of Seed Transmission of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 1966;4:311–32.

Bakker MG, Manter DK, Sheflin AM *et al.* Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil* 2012;360:1–13.

Bamdad H, Papari S, Lazarovits G *et al.* Soil amendments for sustainable agriculture: Microbial organic fertilizers. *Soil Use and Management*, DOI: 10.1111/sum.12762.

Banerjee S, Walder F, Büchi L *et al.* Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME J* 2019;13:1722–36.

Barber CE, Tang JL, Feng JX *et al.* A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology* 1997;24:555–66.

Barret M, Briand M, Bonneau S *et al.* Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:1257–66.

Barret M, Guimbaud J-F, Darrasse A *et al.* Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology* 2016;17:791–5.

Baselga A, Orme CDL. betapart: an R package for the study of beta diversity. *Methods in Ecology and Evolution* 2012;3:808–12.

Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR *et al.* Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* 2014;378:1–33.

Bateman AJ. Self-incompatibility systems in angiosperms. *Heredity* 1952;6:285–310.



- Baud S, Boutin J-P, Miquel M *et al.* An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 2002;40:151–60.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M *et al.* Storage Reserve Accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *Arabidopsis Book* 2008;6:e0113.
- Berendsen RL, Vismans G, Yu K *et al.* Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME J* 2018;12:1496–507.
- Berg G, Raaijmakers JM. Saving seed microbiomes. *ISME J* 2018;12:1167–70.
- Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;68:1–13.
- Bergna A, Cernava T, Rändler M *et al.* Tomato Seeds Preferably Transmit Plant Beneficial Endophytes. *Phytobiomes Journal* 2018;2:183–93.
- Bernal P, Allsopp LP, Filloux A *et al.* The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *ISME J* 2017;11:972–87.
- Bernal P, Llamas MA, Filloux A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental Microbiology* 2018;20:1–15.
- Bewley J. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 1997;9:1055–66.
- Bewley JD, Black M. Seed Development and Maturation. In: Bewley JD, Black M (eds.). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Boston, MA: Springer US, 1994, 35–115.
- Bintarti AF, Sulesky-Grieb A, Stopnisek N *et al.* Endophytic microbiome variation among single plant seeds. *Phytobiomes Journal* 2021:2021.04.27.441449.
- Bliss FA. Common Bean. *Hybridization of Crop Plants*. John Wiley & Sons, Ltd, 1980, 273–84.
- Bodenhausen N. A Synthetic Community Approach Reveals Plant Genotypes Affecting the Phyllosphere Microbiota. *PLoS Genetics* 2014;10:e1004283.
- Bodenhausen N, Somerville V, Desirò A *et al.* *Petunia*- and *Arabidopsis*-Specific Root Microbiota Responses to Phosphate Supplementation. *Phytobiomes Journal* 2019;3:112–24.
- Bordenstein SR, Theis KR. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLoS Biol* 2015;13:e1002226.
- Boulanger A, Zischek C, Lautier M *et al.* The Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Exploits N-Acetylglucosamine during Infection. *mBio* 2021;5:e01527-14.
- Bradbury JF. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB international, 1986.
- Briand M, Bouzid M, Hunault G *et al.* A rapid and simple method for assessing and representing genome sequences relatedness. *bioRxiv* 2019:569640.



- Bright M, Bulgheresi S. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:218–30.
- Brynildsrud O, Bohlin J, Scheffer L *et al.* Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome Biology* 2016;17:238.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods* 2015;12:59–60.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC *et al.* Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. *Cell Host & Microbe* 2015;17:392–403.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K *et al.* Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 2012;488:91–5.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S *et al.* Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* 2013a;64:807–38.
- Burdon RCF, Junker RR, Scofield DG *et al.* Bacteria colonising *Penstemon digitalis* show volatile and tissue-specific responses to a natural concentration range of the floral volatile linalool. *Chemoecology* 2018;28:11–9.
- Busby PE. Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify *Melampsora* rust disease severity. *New Phytologist* 2016;209:1681–92.
- Butaitė E, Baumgartner M, Wyder S *et al.* Siderophore cheating and cheating resistance shape competition for iron in soil and freshwater *Pseudomonas* communities. *Nat Commun* 2017;8:414.
- Büttner H, Niehs SP, Vandelannoote K *et al.* Bacterial endosymbionts protect beneficial soil fungus from nematode attack. *PNAS* 2021;118, DOI: 10.1073/pnas.2110669118.

**-C-**

- Cadotte MW. Dispersal and Species Diversity: A Meta-Analysis. *The American Naturalist* 2006;167:913–24.
- Cadotte MW, Cardinale BJ, Oakley TH. Evolutionary history and the effect of biodiversity on plant productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:17012–7.
- Cai Z, Yuan Z-H, Zhang H *et al.* Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence. *PLOS Pathogens* 2017;13:e1006304.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016;13:581–3.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* 2011;108:4516–22.



- Carrión VJ, Perez-Jaramillo J, Cordovez V *et al.* Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science* 2019;366:606–12.
- Caruso V, Song X, Asquith M *et al.* Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass. *mSystems* 2019;4, DOI: 10.1128/mSystems.00163-18.
- Castledine M, Sierocinski P, Padfield D *et al.* Community coalescence: an eco-evolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2020;375:20190252.
- Cezard C, Farvacques N, Sonnet P. Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Current Medicinal Chemistry* 2015;22:165–86.
- Chahtane H, Nogueira Füller T, Allard P-M *et al.* The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in *Arabidopsis*. *eLife* 2018;7, DOI: 10.7554/eLife.37082.
- Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal* 2014;8:790–803.
- Chase JM. Community assembly: when should history matter? *Oecologia* 2003;136:489–98.
- Chatterjee S, Sonti RV. Virulence deficiency caused by a transposon insertion in the *purH* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Can J Microbiol* 2005;51:575–81.
- Chen M-H, Jack ALH, McGuire IC *et al.* Seed-colonizing bacterial communities associated with the suppression of *Pythium* seedling disease in a municipal biosolids compost. *Phytopathology* 2012;102:478–89.
- Chen T, Nomura K, Wang X *et al.* A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature* 2020a;580:653–7.
- Chen X, Krug L, Yang H *et al.* *Nicotiana tabacum* seed endophytic communities share a common core structure and genotype-specific signatures in diverging cultivars. *Comput Struct Biotechnol J* 2020b;18:287–95.
- Chesneau G, Laroche B, Prévieux A *et al.* Single Seed Microbiota: Assembly and Transmission from Parent Plant to Seedling., 2021:2021.05.31.446402.
- Chesneau G, Torres-Cortes G, Briand M *et al.* Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiol Ecol* 2020, DOI: 10.1093/femsec/fiaa190.
- Chevalier É, Loubert-Hudon A, Zimmerman EL *et al.* Cell–cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization. *New Phytologist* 2011;192:13–28.



- Chialva M, Ghignone S, Cozzi P *et al.* Water management and phenology influence the root-associated rice field microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* 2020;96, DOI: 10.1093/femsec/fiaa146.
- Chimwamurombe PM, Grönemeyer JL, Reinhold-Hurek B. Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. *FEMS Microbiology Ecology* 2016;92, DOI: 10.1093/femsec/fiw083.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist* 2003;157:503–23.
- Coince A, Cordier T, Lengellé J *et al.* Leaf and Root-Associated Fungal Assemblages Do Not Follow Similar Elevational Diversity Patterns. *PLOS ONE* 2014;9:e100668.
- Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I *et al.* Antifungal Activity of Microbial Secondary Metabolites. *PLOS ONE* 2011;6:e25321.
- Coleman-Derr D, Desgarenes D, Fonseca-Garcia C *et al.* Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist* 2016;209:798–811.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 2010;42:669–78.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG *et al.* Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *Microb Ecol* 2011;62:188–97.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A *et al.* Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 2005;71:1685–93.
- Compant S, Samad A, Faist H *et al.* A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research* 2019;19:29–37.
- Conner JK, Sahli HF, Karoly K. Tests of adaptation: functional studies of pollen removal and estimates of natural selection on anther position in wild radish. *Ann Bot* 2009;103:1547–56.
- Conway JR, Lex A, Gehlenborg N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. Hancock J (ed.). *Bioinformatics* 2017;33:2938–40.
- Copeland JK. Seasonal Community Succession of the Phyllosphere Microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2015;28:274–85.
- Cope-Selby N, Cookson A, Squance M *et al.* Endophytic bacteria in *Miscanthus* seed: implications for germination, vertical inheritance of endophytes, plant evolution and breeding. *GCB Bioenergy* 2017;9:57–77.



Crowley DE, Wang YC, Reid CPP *et al.* Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. In: Chen Y, Hadar Y (eds.). Iron Nutrition and Interactions in Plants: "Proceedings of the Fifth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants", 11–17 June 1989, Jerusalem, Israel, 1989. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991, 213–32.

Cui Z, Huntley RB, Zeng Q *et al.* Temporal and spatial dynamics in the apple flower microbiome in the presence of the phytopathogen *Erwinia amylovora*. ISME J 2021;15:318–29.

### -D-

Dai J, Qiu W, Wang N *et al.* From Leguminosae/Gramineae Intercropping Systems to See Benefits of Intercropping on Iron Nutrition. Frontiers in Plant Science 2019;10:605.

Dal Cortivo C, Barion G, Ferrari M *et al.* Effects of Field Inoculation with VAM and Bacteria Consortia on Root Growth and Nutrients Uptake in Common Wheat. Sustainability 2018;10:3286.

Darrasse A, Barret M, Cesbron S *et al.* Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. Plant and Soil 2018;422:115–28.

Darrasse A, Bureau C, Samson R *et al.* Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. Eur J Plant Pathol 2007;119:203–15.

Darrasse A, Darsonval A, Boureau T *et al.* Transmission of Plant-Pathogenic Bacteria by Nonhost Seeds without Induction of an Associated Defense Reaction at Emergence. Appl Environ Microbiol 2010;76:6787–96.

Darsonval A, Darrasse A, Durand K *et al.* Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. MPMI 2009;22:747–57.

Darsonval A, Darrasse A, Meyer D *et al.* 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. Appl Environ Microbiol 2008;74:2669–78.

Davis NM, Proctor DM, Holmes SP *et al.* Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. Microbiome 2018;6:226.

De Cleene M. Scanning electron microscopy of the establishment of compatible and incompatible *Xanthomonas campestris* pathovars on the leaf surface of Italian ryegrass and maize1. EPPO Bulletin 1989;19:81–8.

DeAngelis KM, Brodie EL, DeSantis TZ *et al.* Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. ISME J 2009;3:168–78.

Deka Boruah HP, Dileep Kumar BS. Plant disease suppression and growth promotion by a fluorescent *Pseudomonas* strain. Folia Microbiol 2002;47:137–43.



- Delaux P-M, Schornack S. Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science* 2021;371, DOI: 10.1126/science.aba6605.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S *et al.* Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *PNAS* 2009;106:16428–33.
- Denancé N, Grimault V. Seed pathway for pest dissemination: ISTA Reference Pest List, a bibliographic resource in non-vegetable plant species. 2021.
- Deorowicz S, Gudyś A, Długosz M *et al.* Kmer-db: instant evolutionary distance estimation. *Bioinformatics* 2019;35:133–6.
- Develey-Rivière M-P, Galiana E. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist* 2007;175:405–16.
- Devi G, Mehta G, Kumar S *et al.* Biotechnology: An Intervention for Genetic Resistance Against Seed-Borne Phytopathogens. In: Kumar R, Gupta A (eds.). *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*. Singapore: Springer, 2020, 683–716.
- Díaz Herrera S, Grossi C, Zawoznik M *et al.* Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research* 2016;186–187:37–43.
- Dini-Andreote F, Raaijmakers JM. Embracing Community Ecology in Plant Microbiome Research. *Trends in Plant Science* 2018;23:467–9.
- Dombrowski N, Schlaeppi K, Agler MT *et al.* Root microbiota dynamics of perennial *Arabidopsis alpina* are dependent on soil residence time but independent of flowering time. *The ISME Journal* 2017;11:43–55.
- Donati I, Cellini A, Buriani G *et al.* Pathways of flower infection and pollen-mediated dispersion of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit bacterial canker. *Horticulture Research* 2018;5:56.
- Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R *et al.* Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote *Arabidopsis* Survival. *Cell* 2018;175:973-983.e14.
- Dutta B, Avci U, Hahn MG *et al.* Location of *Acidovorax citrulli* in Infested Watermelon Seeds Is Influenced by the Pathway of Bacterial Invasion. *Phytopathology* 2012;102:461–8.

-E-

- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C *et al.* Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015;112:E911–20.



Escobar Rodriguez C, Antonielli L, Mitter B *et al.* Heritability and functional importance of the *Setaria viridis* L. bacterial seed microbiome. *Phytobiomes Journal* 2019, DOI: 10.1094/PBIOMES-04-19-0023-R.

Etebu A, Nwauzoma AB. A mini-review on the development and emerging perspectives of seed pathology. *Microbiol Res Int* 2017;5:1–7.

Evans S, Martiny JBH, Allison SD. Effects of dispersal and selection on stochastic assembly in microbial communities. *ISME J* 2017;11:176–85.

Eyre AW, Wang M, Oh Y *et al.* Identification and Characterization of the Core Rice Seed Microbiome. *Phytobiomes Journal* 2019;3:148–57.

## -F-

Fait A, Angelovici R, Less H *et al.* Arabidopsis Seed Development and Germination Is Associated with Temporally Distinct Metabolic Switches. *Plant Physiology* 2006;142:839–54.

Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 1992;61:1–10.

Fargier E, Manceau C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 2007;56:805–18.

Ferreira A, Quecine MC, Lacava PT *et al.* Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea* agglomerans. *FEMS Microbiol Lett* 2008;287:8–14.

Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:579–90.

Fierer N, Nemergut D, Knight R *et al.* Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* 2010;161:635–42.

Figueiredo dos Santos L, Fernandes Souta J, de Paula Soares C *et al.* Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination. *FEMS Microbiology Ecology* 2021;97, DOI: 10.1093/femsec/fiab024.

Fine PVA, Kembel SW. Phylogenetic community structure and phylogenetic turnover across space and edaphic gradients in western Amazonian tree communities. *Ecography* 2011;34:552–65.

Fitzpatrick CR, Copeland J, Wang PW *et al.* Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018;115:E1157–65.

Fitzpatrick CR, Salas-González I, Conway JM *et al.* The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annual Review of Microbiology* 2020;74:null.



- Fodelianakis S, Valenzuela-Cuevas A, Barozzi A *et al.* Direct quantification of ecological drift at the population level in synthetic bacterial communities. *ISME J* 2021;15:55–66.
- Fort T, Pauvert C, Zanne AE *et al.* Maternal effects shape the seed mycobiome in *Quercus petraea*. *New Phytologist* 2021;230:1594–608.
- Frank AC, Saldierna Guzmán JP, Shay JE. Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms* 2017;5:70.
- Frankel R, Galun E. Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding. *Experimental Agriculture*, Cambridge Core 1977.
- Free JB. The pollination requirements of broad beans and field beans (*Vicia faba*). *The Journal of Agricultural Science* 1966a;66:395–7.
- Free JB. The Pollination of the Beans *Phaseolus Multiflorus* and *Phaseolus Vulgaris* by Honeybees. *Journal of Apicultural Research* 1966b;5:87–91.
- Fukami T. Historical Contingency in Community Assembly: Integrating Niches, Species Pools, and Priority Effects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2015;46:1–23.

**-G-**

- Gagic M, Faville MJ, Zhang W *et al.* Seed Transmission of *Epichloë* Endophytes in *Lolium perenne* Is Heavily Influenced by Host Genetics. *Front Plant Sci* 2018;9, DOI: 10.3389/fpls.2018.01580.
- Gagne-Bourgue F, Aliferis K a., Seguin P *et al.* Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *J Appl Microbiol* 2013;114:836–53.
- Gao C, Montoya L, Xu L *et al.* Fungal community assembly in drought-stressed sorghum shows stochasticity, selection, and universal ecological dynamics. *Nature Communications* 2020;11:1–14.
- Gao M, Xiong C, Gao C *et al.* Disease-induced changes in plant microbiome assembly and functional adaptation. *Microbiome* 2021;9:187.
- Gao W, Zheng C, Lei Y *et al.* Analysis of Bacterial Communities in White Clover Seeds via High-Throughput Sequencing of 16S rRNA Gene. *Curr Microbiol* 2019;76:187–93.
- Gava CAT, Pinto JM. Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *melonis* using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. *Biological Control* 2016;97:13–20.
- Gdanetz K, Noel Z, Trail F. Influence of Plant Host and Organ, Management Strategy, and Spore Traits on Microbiome Composition. *Phytobiomes Journal* 2021;5:202–19.



- Ghoul M, Mitri S. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology* 2016;24:833–45.
- Gilchrist CLM, Chooi Y-H. *clinker* & *clustermap.js*: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics* 2021;37:2473–5.
- Gitaitis R, Walcott R. The Epidemiology and Management of Seedborne Bacterial Diseases. *Annual Review of Phytopathology* 2007;45:371–97.
- Gledhill M, Buck K. The Organic Complexation of Iron in the Marine Environment: A Review. *Frontiers in Microbiology* 2012;3:69.
- Goggin DE, Emery RJN, Kurepin LV *et al.* A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Ann Bot* 2015;115:293–301.
- Gopal M, Gupta A. Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Frontiers in Microbiology* 2016;7:1971.
- Govindaraj M, Masilamani P, Albert VA *et al.* Effect of physical seed treatment on yield and quality of crops: A review. *Agricultural Reviews* 2017, DOI: 10.18805/ag.v0iOF.7304.
- Granato ET, Meiller-Legrand TA, Foster KR. The Evolution and Ecology of Bacterial Warfare. *Current Biology* 2019;29:R521–37.
- Green SJ, Inbar E, Michel FC *et al.* Succession of Bacterial Communities during Early Plant Development: Transition from Seed to Root and Effect of Compost Amendment. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72:3975–83.
- Griffin AS, West SA, Buckling A. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature* 2004;430:1024–7.
- Grillet L, Mari S, Schmidt W. Iron in seeds – loading pathways and subcellular localization. *Frontiers in Plant Science* 2014;4:535.
- Grimault V. *Semences végétales, quels enjeux pour notre avenir.* 2019.
- Grunenwald CM, Choby JE, Juttukonda LJ *et al.* Manganese Detoxification by MntE Is Critical for Resistance to Oxidative Stress and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *mBio* 10:e02915-18.
- Gu S, Wei Z, Shao Z *et al.* Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. *Nature Microbiology* 2020a:1–9.
- Gu S, Yang T, Shao Z *et al.* Siderophore-Mediated Interactions Determine the Disease Suppressiveness of Microbial Consortia. *mSystems* 2020b;5, DOI: 10.1128/mSystems.00811-19.



Guo J, Ling N, Li Y *et al.* Seed-borne, endospheric and rhizospheric core microbiota as predictors of plant functional traits across rice cultivars are dominated by deterministic processes. *New Phytol* 2021;230:2047–60.

### -H-

Haapalainen M, Mosorin H, Dorati F *et al.* Hcp2, a Secreted Protein of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*, Is Required for Fitness for Competition against Bacteria and Yeasts. *Journal of Bacteriology* 2012;194:4810–22.

Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R *et al.* Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology* 2017;55:565–89.

Hamonts K, Trivedi P, Garg A *et al.* Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. *Environ Microbiol* 2018;20:124–40.

Han G-Z. Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist* 2019;222:70–83.

Hardoim PR, Hardoim CCP, Overbeek LS van *et al.* Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PLOS ONE* 2012;7:e30438.

Hartman K, van der Heijden MGA, Wittwer RA *et al.* Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome* 2018;6:14.

Hassett DJ, Howell ML, Sokol PA *et al.* Fumarase C activity is elevated in response to iron deprivation and in mucoid, alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of *fumC* and purification of native *fumC*. *Journal of Bacteriology* 1997;179:1442–51.

Hawladar MSH, Mian MAK. Self-incompatibility studies in local cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.) grown in Bangladesh. *Euphytica* 1997;96:311–5.

Health (PLH) EP on P, Bragard C, Dehnen-Schmutz K *et al.* Risk assessment of the entry of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* on maize seed imported by the EU from the USA. *EFSA Journal* 2019;17:e05851.

Helfrich EJN, Vogel CM, Ueoka R *et al.* Bipartite interactions, antibiotic production and biosynthetic potential of the *Arabidopsis* leaf microbiome. *Nat Microbiol* 2018;3:909–19.

Hesse C, Schulz F, Bull CT *et al.* Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology* 2018;20:2142–59.

Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR *et al.* Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:15–25.

Hou S, Thiergart T, Vannier N *et al.* A microbiota–root–shoot circuit favours *Arabidopsis* growth over defence under suboptimal light. *Nat Plants* 2021:1–15.



- Hu L, Yang L. Time to Fight: Molecular Mechanisms of Age-Related Resistance. *Phytopathology* 2019;109:1500–8.
- Huang C-Y, Wang H, Hu P *et al.* Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe* 2019;26:173–82.
- Huang T-P, Somers EB, Wong ACL. Differential Biofilm Formation and Motility Associated with Lipopolysaccharide/Exopolysaccharide-Coupled Biosynthetic Genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology* 2006;188:3116–20.
- Huang Y, Kuang Z, Wang W *et al.* Exploring potential bacterial and fungal biocontrol agents transmitted from seeds to sprouts of wheat. *Biological Control* 2016;Complete:27–33.
- Hubbard CJ, Brock MT, van Diepen LT *et al.* The plant circadian clock influences rhizosphere community structure and function. *The ISME Journal* 2018;12:400–10.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K *et al.* eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D286–93.
- Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB *et al.* Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1992;56:573–8.

**-I-**

- Ibeas MA, Grant-Grant S, Navarro N *et al.* Dynamic Subcellular Localization of Iron during Embryo Development in Brassicaceae Seeds. *Frontiers in Plant Science* 2017;8:2186.
- Ikeda S, Anda M, Inaba S *et al.* Autoregulation of Nodulation Interferes with Impacts of Nitrogen Fertilization Levels on the Leaf-Associated Bacterial Community in Soybeans. *Applied and Environmental Microbiology* 2011;77:1973–80.
- ISTA, International Rules for Seed Testing. Vol 2015. 2015, Chapter 5, i-5-56 (60).

**-J-**

- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N *et al.* Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *MPMI* 2002;15:894–906.
- Jefferson R. *The Hologenome. Agriculture, Environment and the Developing World: A Future of PCR.* Cold Spring Harbor 1994.
- Jenkins A, Cote C, Twenhafel N *et al.* Role of Purine Biosynthesis in *Bacillus anthracis* Pathogenesis and Virulence. *Infection and Immunity* 2011;79:153–66.
- Jeong J, Cochu C, Kerkeb L *et al.* Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *PNAS* 2008;105:10619–24.



- Jiang B-L, Jiang G-F, Liu W *et al.* RpfC regulates the expression of the key regulator hrpX of the hrp/T3SS system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiol* 2018;18:103.
- Jiang N, Lv QY, Xu X *et al.* Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and in planta resuscitation of the cells on tomato seedlings. *Plant Pathology* 2016;65:826–36.
- Johnson KL, Walcott RR. Quorum Sensing Contributes to Seed-to-Seedling Transmission of *Acidovorax citrulli* on Watermelon. *Journal of Phytopathology* 2013;161:562–73.
- Johnston-Monje D, Lundberg DS, Lazarovits G *et al.* Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. *Plant Soil* 2016;405:337–55.
- Johnston-Monje D, Raizada MN. Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology. *PLOS ONE* 2011;6:e20396.
- Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature* 2006;444:323–9.
- Joseph B, Mertins S, Stoll R *et al.* Glycerol Metabolism and PrfA Activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 2008;190:5412–30.
- Ju C, Yoon GM, Shemansky JM *et al.* CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:19486–91.
- K-**
- Kan Y, Jiang N, Xu X *et al.* Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. *Front Microbiol* 2019;10, DOI: 10.3389/fmicb.2019.01081.
- Kardol P, Souza L, Classen AT. Resource availability mediates the importance of priority effects in plant community assembly and ecosystem function. *Oikos* 2013;122:84–94.
- Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR *et al.* Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 2010;26:1463–4.
- Kercher S, Conner J. Patterns of Genetic Variability within and among Populations of Wild Radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 1996.
- Khalaf EM, Raizada MN. Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family. *BMC Microbiol* 2016;16:131.
- Kim H, Lee Y-H. Spatiotemporal Assembly of Bacterial and Fungal Communities of Seed-Seedling-Adult in Rice. *Frontiers in Microbiology* 2021;12:2265.
- Kim W-I, Choi SY, Han I *et al.* Inhibition of *Salmonella enterica* growth by competitive exclusion during early alfalfa sprout development using a seed-dwelling *Erwinia persicina* strain EUS78. *International Journal of Food Microbiology* 2020;312:108374.



- Kindt R. BiodiversityR. Package for Community Ecology and Suitability Analysis. <https://cran.r-project.org/web/packages/BiodiversityR/index.html>. 2015.
- Klaedtke S, Jacques M-A, Raggi L *et al.* Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages: Terroir shapes the seed microbiota. *Environmental Microbiology* 2016;18:1792–804.
- Kniskern JM, Traw MB, Bergelson J. Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Defense Pathways Reduce Natural Bacterial Diversity on *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 2007;20:1512–22.
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science* 2019;10:845.
- Kolde R. Pheatmap: Pretty Heatmaps., 2019.
- Kramer J, Özkaya Ö, Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2020;18:152–63.
- Kremer JM. Characterization of axenic immune deficiency in *Arabidopsis thaliana*. 2017:24.
- Kremer JM, Sohrabi R, Paasch BC *et al.* Peat-based gnotobiotic plant growth systems for *Arabidopsis* microbiome research. *Nat Protoc* 2021;16:2450–70.
- Kumar S. Cultural Approaches for Plant Disease Management. *Research & Reviews: Journal of Agricultural Science and Technology* 2018;1:17–26.
- Kurowski C, Remeus PM. Proposal for a new method for detecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on bean seeds. 2007:1–12.
- Kwak M-J, Kong HG, Choi K *et al.* Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology* 2018;36:1100–9.
- L-
- La Torre A, Caradonia F, Matere A *et al.* Using plant essential oils to control *Fusarium* wilt in tomato plants. *Eur J Plant Pathol* 2016;144:487–96.
- Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW. Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome* 2016;4:1–10.
- Lamichhane JR, Osdaghi E, Behlau F *et al.* Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agron Sustain Dev* 2018;38:28.
- Lamont IL, Martin LW, Sims T *et al.* Characterization of a Gene Encoding an Acetylase Required for Pyoverdine Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 2006;188:3149–52.
- Laroche F, Violle C, Taudière A *et al.* Analyzing snapshot diversity patterns with the Neutral Theory can show functional groups' effects on community assembly. *Ecology* 2020;101:e02977.



- Lau JA, Lennon JT. Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109:14058–62.
- Laursen JB, Nielsen J. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity. *Chem Rev* 2004;104:1663–86.
- Lebeis SL, Paredes SH, Lundberg DS *et al.* Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science* 2015;349:860–4.
- Leff JW, Lynch RC, Kane NC *et al.* Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. *New Phytol* 2017;214:412–23.
- de León L, Siverio F, López MM *et al.* *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a Seedborne Tomato Pathogen: Healthy Seeds Are Still the Goal. *Plant Disease* 2011;95:1328–38.
- Leonard SP, Perutka J, Powell JE *et al.* Genetic Engineering of Bee Gut Microbiome Bacteria with a Toolkit for Modular Assembly of Broad-Host-Range Plasmids. *ACS Synth Biol* 2018;7:1279–90.
- Leprieur F, Albouy C, De Bortoli J *et al.* Quantifying Phylogenetic Beta Diversity: Distinguishing between ‘True’ Turnover of Lineages and Phylogenetic Diversity Gradients. Shawkey M (ed.). *PLoS ONE* 2012;7:e42760.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S *et al.* Late seed maturation: drying without dying. *J Exp Bot* 2017;68:827–41.
- Lessl JT, Fessehaie A, Walcott RR. Colonization of Female Watermelon Blossoms by *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli* and the Relationship between Blossom Inoculum Dosage and Seed Infestation. *Journal of Phytopathology* 2007;155:114–21.
- Lestienne I, Icard-Vernière C, Mouquet C *et al.* Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry* 2005;89:421–5.
- Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 2016;44:W242–5.
- Li L, Kim P, Yu L *et al.* Activation-Dependent Destruction of a Co-receptor by a *Pseudomonas syringae* Effector Dampens Plant Immunity. *Cell Host & Microbe* 2016;20:504–14.
- Li P, Lu Y-J, Chen H *et al.* The Lifecycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2020;39:72–100.
- Li R, Zhu H, Ruan J *et al.* De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res* 2010;20:265–72.
- Liljegren SJ, Roeder AHK, Kempin SA *et al.* Control of Fruit Patterning in *Arabidopsis* by indehiscent. *Cell* 2004;116:843–53.



- Links MG, Demeke T, Gräfenhan T *et al.* Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on Triticum and Brassica seeds. *New Phytol* 2014;202:542–53.
- Liu H, Carvalhais LC, Crawford M *et al.* Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:2552.
- Liu J, Nagabhyru P, Schardl C. Epichloë festucae endophytic growth in florets, seeds, and seedlings of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycologia* 2017;109:1–10.
- Liu Y, Zuo S, Xu L *et al.* Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Arch Microbiol* 2012;194:1001–12.
- Liu Y, Zuo S, Zou Y *et al.* Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Ann Microbiol* 2013a;63:71–9.
- Lohrke SM, Dery PD, Li W *et al.* Mutation of *rpiA* in *Enterobacter cloacae* Decreases Seed and Root Colonization and Biocontrol of Damping-Off Caused by *Pythium ultimum* on Cucumber. *MPMI* 2002;15:817–25.
- López-López A, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E *et al.* Phaseolus vulgaris seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 2010;33:322–7.
- Lopez-Velasco G, Carder PA, Welbaum GE *et al.* Diversity of the spinach (*Spinacia oleracea*) spermosphere and phyllosphere bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters* 2013;346:146–54.
- Lopez-Velasco G, Welbaum GE, Boyer RR *et al.* Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons: Pyrosequencing of spinach microbiome. *Journal of Applied Microbiology* 2011;110:1203–14.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 2014;15:550.
- Lozupone C, Knight R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2005;71:8228–35.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH *et al.* Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 2012;488:86–90.
- Luneau JS, Cerutti A, Roux B *et al.* Xanthomonas Transcriptome inside Cauliflower Hydathodes Reveals Bacterial Virulence Strategies and Physiological Adaptation at Early Infection Stages., 2021:2021.01.19.427230.
- Lutz W, Sanderson W, Scherbov S. The end of world population growth. *Nature* 2001;412:543–5.



Lymperopoulou DS, Adams RI, Lindow SE. Contribution of Vegetation to the Microbial Composition of Nearby Outdoor Air. Löffler FE (ed.). *Applied and Environmental Microbiology* 2016;82:3822–33.

### -M-

Ma L-S, Hachani A, Lin J-S *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* Deploys a Superfamily of Type VI Secretion DNase Effectors as Weapons for Interbacterial Competition In Planta. *Cell Host & Microbe* 2014;16:94–104.

Maida I, Chiellini C, Mengoni A *et al.* Antagonistic interactions between endophytic cultivable bacterial communities isolated from the medicinal plant *Echinacea purpurea*. *Environmental Microbiology* 2016;18:2357–65.

Maignien L, DeForce EA, Chafee ME *et al.* Ecological Succession and Stochastic Variation in the Assembly of *Arabidopsis thaliana* Phyllosphere Communities. *mBio* 2014;5, DOI: 10.1128/mBio.00682-13.

Manirajan BA, Ratering S, Rusch V *et al.* Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environmental Microbiology* 2016;18:5161–74.

Manners JM, Penninckx IAMA, Vermaere K *et al.* The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol* 1998;38:1071–80.

Mano H, Tanaka F, Watanabe A *et al.* Culturable Surface and Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Seeds of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. *Microbes and Environments* 2006;21:86–100.

Mansvelt EL, Hattingh MJ. Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Can J Bot* 1987;65:2517–22.

Martin JE, Lisher JP, Winkler ME *et al.* Perturbation of manganese metabolism disrupts cell division in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 2017;104:334–48.

Martin JE, Waters LS, Storz G *et al.* The *Escherichia coli* Small Protein MntS and Exporter MntP Optimize the Intracellular Concentration of Manganese. *PLOS Genetics* 2015;11:e1004977.

Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 2011;17:10–2.

Matsumoto H, Fan X, Wang Y *et al.* Bacterial seed endophyte shapes disease resistance in rice. *Nat Plants* 2021, DOI: 10.1038/s41477-020-00826-5.

Matzanke BF, Anemüller S, Schünemann V *et al.* FhuF, Part of a Siderophore–Reductase System. *Biochemistry* 2004;43:1386–92.



- Maude RB. Seedborne diseases and their control: principles and practice. Seedborne diseases and their control: principles and practice 1996.
- McCall AC, Irwin RE. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. *Ecology Letters* 2006;9:1351–65.
- McFrederick QS, Thomas JM, Neff JL *et al.* Flowers and Wild Megachilid Bees Share Microbes. *Microb Ecol* 2017;73:188–200.
- McKey D. Adaptive Patterns in Alkaloid Physiology. *The American Naturalist* 1974;108:305–20.
- McLaren MR, Callahan BJ. Pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome. *Phil Trans R Soc B* 2020;375:20190592.
- McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 2013a;8:e61217.
- McPhail KL, Armstrong DJ, Azevedo MD *et al.* 4-Formylaminoxyvinylglycine, an Herbicidal Germination-Arrest Factor from *Pseudomonas* Rhizosphere Bacteria. *Journal of Natural Products* 2010;73:1853–7.
- Meakin PJ, Roberts JA. Dehiscence of Fruit in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.)I. ANATOMY OF POD DEHISCENCE. *J Exp Bot* 1990;41:995–1002.
- Meldau S, Erb M, Baldwin IT. Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Ann Bot* 2012;110:1503–14.
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I *et al.* Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science* 2011;332:1097–100.
- Mercado-Blanco J, Bakker PAHM. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek* 2007;92:367–89.
- Meyer J-M, Gruffaz C, Raharinosy V *et al.* Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* 2008;21:259–71.
- Michavila G, Adler C, Gregorio PRD *et al.* *Pseudomonas protegens* CS1 from the lemon phyllosphere as a candidate for citrus canker biocontrol agent. *Plant Biology* 2017;19:608–17.
- Micheloni C, Plakolm G, Schärer H. Report on seed born diseases in organic seed and propagation material. 2007:32p.
- Mitter B, Pfaffenbichler N, Flavell R *et al.* A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds. *Frontiers in Microbiology* 2017;8, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00011.



- Molina MA, Godoy P, Ramos-González MI *et al.* Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 2005;7:443–9.
- Mommaerts V, Put K, Vandeven J *et al.* Development of a new dispenser for microbiological control agents and evaluation of dissemination by bumblebees in greenhouse strawberries. *Pest Management Science* 2010;66:1199–207.
- Mony C, Vandenkoornhuysse P, Bohannan BJM *et al.* A Landscape of Opportunities for Microbial Ecology Research. *Front Microbiol* 2020;11, DOI: 10.3389/fmicb.2020.561427.
- Morales Moreira ZP, Helgason BL, Germida JJ. Crop, genotype, and field environmental conditions shape bacterial and fungal seed epiphytic microbiomes. *Can J Microbiol* 2020, DOI: 10.1139/cjm-2020-0306.
- Moroenyane I, Mendes L, Tremblay J *et al.* Plant Compartments and Developmental Stages Modulate the Balance between Niche-Based and Neutral Processes in Soybean Microbiome. *Microb Ecol* 2021, DOI: 10.1007/s00248-021-01688-w.
- Morris C, Kinkel L. Fifty years of phyllosphere microbiology: Significant contributions to research in related fields. *Phyllosphere Microbiology* 2002:365–75.
- El-mougy N, Abdel-Kader M, Aly M *et al.* Application of Fungicides Alternatives as Seed Treatment for Controlling Root Rot of Some Vegetables in Pot Experiments. *Advances in Life Sciences* 2012;2:57–64.
- Mouquet N, Loreau M. Community Patterns in Source-Sink Metacommunities. *The American Naturalist* 2003;162:544–57.
- Müller DB, Vogel C, Bai Y *et al.* The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annual Review of Genetics* 2016;50:211–34.
- Mundt JO, Hinkle NF. Bacteria within ovules and seeds. *Appl Environ Microbiol* 1976;32:694–8.
- N-**
- Nega A. Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. *Journal of Biology* 2014:23.
- Nelson EB. Microbial Dynamics and Interactions in the Spermiosphere. *Annual Review of Phytopathology* 2004;42:271–309.
- Nelson EB. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil* 2018;422:7–34.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T *et al.* Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013;77:342–56.
- Newcombe G. A Hypothetical Bottleneck in the Plant Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 2018;9, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01645.



Newcombe G, Harding A, Ridout M *et al.* A Hypothetical Bottleneck in the Plant Microbiome. *Frontiers in Microbiology* 2018;9, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01645.

Nobori T, Wang Y, Wu J *et al.* Multidimensional gene regulatory landscape of a bacterial pathogen in plants. *Nat Plants* 2020:1–14.

**-O-**

O’Callaghan M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:5729–46.

Ofek M, Hadar Y, Minz D. Colonization of cucumber seeds by bacteria during germination. *Environmental Microbiology* 2011;13:2794–807.

Ogutcen E, Pandey A, Khan MK *et al.* Pod Shattering: A Homologous Series of Variation Underlying Domestication and an Avenue for Crop Improvement. *Agronomy* 2018;8:137.

Oksanen J, Blanchet F, Kindt R *et al.* *vegan: Community Ecology Package* version 2.5-6 from CRAN. 2017.

Okunishi S, Sako K, Mano H *et al.* Bacterial Flora of Endophytes in the Maturing Seed of Cultivated Rice (*Oryza sativa*). *Microb Environ* 2005;20:168–77.

Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 2005;43 Spec No:93–100.

Ottesen AR, Gorham S, Reed E *et al.* Using a Control to Better Understand Phyllosphere Microbiota. *Virolle M-J (ed.). PLOS ONE* 2016;11:e0163482.

**-P-**

Pandey SS, Patnana PK, Rai R *et al.* Xanthoferrin, the  $\alpha$ -hydroxycarboxylate-type siderophore of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, is required for optimum virulence and growth inside cabbage: Siderophore in *Xanthomonas campestris* virulence. *Molecular Plant Pathology* 2017;18:949–62.

Panke-Buisse K, Lee S, Kao-Kniffin J. Cultivated Sub-Populations of Soil Microbiomes Retain Early Flowering Plant Trait. *Microbial Ecology* 2017;73:394–403.

Park H-H, Kim JJ, Kim K-H *et al.* Dissemination of *Bacillus Subtilis* by using Bee-vectoring Technology in Cherry Tomato Greenhouses. *Korean journal of applied entomology* 2013;52:357–64.

Patanita M, Campos MD, Félix M do R *et al.* Effect of Tillage System and Cover Crop on Maize Mycorrhization and Presence of *Magnaportheopsis maydis*. *Biology* 2020;9:46.

Patro R, Duggal G, Love MI *et al.* Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 2017;14:417–9.



- Pérez-Jaramillo JE, Carrión VJ, Bosse M *et al.* Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *The ISME Journal* 2017;11:2244–57.
- Pérez-Jaramillo JE, Mendes R, Raaijmakers JM. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol Biol* 2016;90:635–44.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C *et al.* Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012;28:489–521.
- Pinto-Carbó M, Gademann K, Eberl L *et al.* Leaf nodule symbiosis: function and transmission of obligate bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 2018;44:23–31.
- Piper KR, Bodman SB von, Hwang I *et al.* Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Molecular Microbiology* 1999;32:1077–89.
- Pitzschke A. Developmental Peculiarities and Seed-Borne Endophytes in Quinoa: Omnipresent, Robust Bacilli Contribute to Plant Fitness. *Front Microbiol* 2016;7, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00002.
- Pochon S, Terrasson E, Guillemette T *et al.* The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant Methods* 2012;8:16.
- Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:291–303.
- Prado A, Marolleau B, Vaissière BE *et al.* Insect pollination is an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *bioRxiv* 2019:626895.
- Prado A, Marolleau B, Vaissière BE *et al.* Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Scientific Reports* 2020;10:1–11.
- Price MN. Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of unknown function. *Nature* 2018;557:503–9.
- Price MN, Arkin AP. PaperBLAST: Text Mining Papers for Information about Homologs. *mSystems* 2:e00039-17.
- Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology* 2006;2:71–8.
- Puente ME, Li CY, Bashan Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany* 2009;66:389–401.



Qiu Z, Egidio E, Liu H *et al.* New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. *Biotechnology Advances* 2019;37:107371.

**-R-**

Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;81:537.

Rahman MM-E, Ali E, ALI M. Hot water thermal treatment for controlling seed-borne mycoflora of maize. *Crops and Production* 2008;3.

Ramankutty N, Mehrabi Z, Waha K *et al.* Trends in Global Agricultural Land Use: Implications for Environmental Health and Food Security. *Annual Review of Plant Biology* 2018;69:789–815.

Ramonedo J, Le Roux JJ, Frossard E *et al.* Experimental assembly reveals ecological drift as a major driver of root nodule bacterial diversity in a woody legume crop. *FEMS Microbiol Ecol* 2020;96:fiaa083.

Randhawa PS, Schaad NW. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. 1984:268–72.

Raskin I. Salicylate, A New Plant Hormone. *Plant Physiol* 1992;99:799–803.

Reddy PP. *Recent Advances in Crop Protection*. Springer India, 2013.

Reisberg EE. Distinct Phyllosphere Bacterial Communities on Arabidopsis Wax Mutant Leaves. *PLoS ONE* 2013;8:e78613.

Reitz ZL, Hardy CD, Suk J *et al.* Genomic analysis of siderophore  $\beta$ -hydroxylases reveals divergent stereocontrol and expands the condensation domain family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116:19805–14.

Rezki S, Campion C, Iacomi-Vasilescu B *et al.* Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *PeerJ* 2016;4:e1923.

Rezki S, Campion C, Simoneau P *et al.* Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and Soil* 2018;422:67–79.

Ribeiro CMC, Souza GR de, Schurt DA *et al.* Pyoverdine use for the control of passion fruit bacterial blight. *Pesq agropec bras* 2017;52:956–9.

Ridout M, Newcombe G. Disease suppression in winter wheat from novel symbiosis with forest fungi. *Fungal Ecology* 2016;20:40–8.

Ridout ME, Schroeder KL, Hunter SS *et al.* Priority effects of wheat seed endophytes on a rhizosphere symbiosis. *Symbiosis* 2019;78:19–31.



- Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology* 1999;7:129–33.
- Rillig MC, Antonovics J, Caruso T *et al.* Interchange of entire communities: microbial community coalescence. *Trends in Ecology & Evolution* 2015;30:470–6.
- Ringel MT, Brüser T. The biosynthesis of pyoverdines. *Microb Cell* 2018;5:424–37.
- Roberts DP, Dery PD, Yucel I *et al.* Role of *pfkA* and General Carbohydrate Catabolism in Seed Colonization by *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology* 1999a;65:2513–9.
- Roberts SJ, Hiltunen LH, Hunter PJ *et al.* Transmission from Seed to Seedling and Secondary Spread of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in Brassica Transplants: Effects of Dose and Watering Regime. *European Journal of Plant Pathology* 1999b;105:879–89.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just jasmonate-salicylate Antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 2011;49:317–43.
- Rochefort A, Briand M, Marais C *et al.* Influence of environment and host plant genotype on the structure and diversity of the Brassica napus seed microbiota. *Phytobiomes Journal* 2019, DOI: 10.1094/PBIOMES-06-19-0031-R.
- Rochefort A, Simonin M, Marais C *et al.* Asymmetric outcome of community coalescence of seed and soil microbiota during early seedling growth. *bioRxiv* 2020:2020.11.19.390344.
- Rochefort A, Simonin M, Marais C *et al.* Transmission of Seed and Soil Microbiota to Seedling. *mSystems* 2021;6:e00446-21.
- Rodrigues Pereira AS, Houwen PJW, Deurenberg-Vos HWJ *et al.* Cytokinins and the bacterial symbiosis of *Ardisia* species. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 1972;68:170–7.
- Rodríguez CE, Antonielli L, Mitter B *et al.* Heritability and Functional Importance of the *Setaria viridis* Bacterial Seed Microbiome. *Phytobiomes Journal* 2019:PBIOMES-04-19-0023-R.
- Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E *et al.* Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J* 2008;2:404–16.
- Rodríguez-Echeverría S, Lozano YM, Bardgett RD. Influence of soil microbiota in nurse plant systems. *Functional Ecology* 2016;30:30–40.
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 2018;6:78.
- Rouphael Y, Colla G. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 2018;9:1655.



Ruffio-Châble V, Hervé Y, Dumas C *et al.* Distribution of S-haplotypes and its relationship with self-incompatibility in *Brassica oleracea*. Part 1. In inbred lines of cauliflower (*B. oleracea* var 'botrytis'): *Theor Appl Genet* 1997;94:338–46.

Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:137–48.

Rybakova D, Mancinelli R, Wikström M *et al.* The structure of the *Brassica napus* seed microbiome is cultivar-dependent and affects the interactions of symbionts and pathogens. *Microbiome* 2017;5, DOI: 10.1186/s40168-017-0310-6.

-S-

S Bachman K. State of the World's Plants Report. Kew, 2016.

Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. La reproduction animale et humaine. Editions Quae, 2014.

Samant S, Lee H, Ghassemi M *et al.* Nucleotide Biosynthesis Is Critical for Growth of Bacteria in Human Blood. *PLOS Pathogens* 2008;4:e37.

Sánchez-López AS. Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of *Crotalaria pumila* growing on metal mine residues. *Plant and Soil* 2018;422:51–66.

Santhanam R, Luu VT, Weinhold A *et al.* Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015;112:E5013–20.

dos Santos LF, Souta JF, Soares C de P *et al.* Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during maize germination. *FEMS Microbiology Ecology* 2021, DOI: 10.1093/femsec/fiab024.

Sarneel JM, Kardol P, Nilsson C. The importance of priority effects for riparian plant community dynamics. *Journal of Vegetation Science* 2016;27:658–67.

Sasse J, Martinoia E, Northen T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science* 2018;23:25–41.

Scarafoni A, Ronchi A, Prinsi B *et al.* The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. *The FEBS Journal* 2013;280:1443–59.

Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ. Symbioses of Grasses with Seedborne Fungal Endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 2004;55:315–40.

Schiltz S, Gaillard I, Pawlicki-Jullian N *et al.* A review: what is the spermosphere and how can it be studied? *Journal of Applied Microbiology* 2015;119:1467–81.



- Schlaeppli K, Dombrowski N, Oter RG *et al.* Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014;111:585–92.
- Schliep KP. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 2011;27:592–3.
- Schmidt R, Cordovez V, de Boer W *et al.* Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J* 2015;9:2329–35.
- Schoelz JE, Stewart LR. The Role of Viruses in the Phytobiome. *Annual Review of Virology* 2018;5:93–111.
- Schulz S, Dickschat JS, Kunze B *et al.* Biological Activity of Volatiles from Marine and Terrestrial Bacteria. *Marine Drugs* 2010;8:2976–87.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–9.
- Sessitsch A, Mitter B. 21st century agriculture: integration of plant microbiomes for improved crop production and food security. *Microb Biotechnol* 2015;8:32–3.
- Shade A, Jacques M-A, Barret M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology* 2017;37:15–22.
- Shade A, Jones SE, Caporaso JG *et al.* Conditionally Rare Taxa Disproportionately Contribute to Temporal Changes in Microbial Diversity. *mBio* 2014;5, DOI: 10.1128/mBio.01371-14.
- Shade A, McManus PS, Handelsman J. Unexpected Diversity during Community Succession in the Apple Flower Microbiome. *mBio* 2013;4:e00602-12.
- Sharma KK, Singh US, Sharma P *et al.* Seed treatments for sustainable agriculture-A review. *Journal of Applied and Natural Science* 2015;7:521–39.
- Shi S, Nuccio E, Herman DJ *et al.* Successional Trajectories of Rhizosphere Bacterial Communities over Consecutive Seasons. *mBio* 2015;6, DOI: 10.1128/mBio.00746-15.
- Shimelis EA, Rakshit SK. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *LWT - Food Science and Technology* 2005;38:331–8.
- Shmida A, Wilson MV. Biological Determinants of Species Diversity. *Journal of Biogeography* 1985;12:1–20.
- Shyntum DY, Venter SN, Moleleki LN *et al.* Comparative genomics of type VI secretion systems in strains of *Pantoea ananatis* from different environments. *BMC Genomics* 2014;15:163.
- Simonin M, Briand M, Chesneau G *et al.* Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. *bioRxiv* 2021:2021.06.08.447541.



- Singer E, Bonnette J, Kenaley SC *et al.* Plant compartment and genetic variation drive microbiome composition in switchgrass roots. *Environmental Microbiology Reports* 2019;11:185–95.
- Singh D, Mathur SB eds. Location of Fungal Hyphae in Seeds. *Histopathology of Seed-Borne Infections*. CRC Press, 2004a.
- Singh D, Mathur SB. *Histopathology of Seed-Borne Infections*. CRC Press, 2004b.
- Sloan WT, Woodcock S, Lunn M *et al.* Modeling Taxa-Abundance Distributions in Microbial Communities using Environmental Sequence Data. *Microb Ecol* 2007;53:443–55.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q *et al.* Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* 1998;12:3703–14.
- Soldan R, Fusi M, Cardinale M *et al.* The effect of plant domestication on host control of the microbiota. *Commun Biol* 2021;4:1–9.
- Solé RV, Alonso D, McKane A. Self-organized instability in complex ecosystems. Solé RV, Levin SA (eds.). *Phil Trans R Soc Lond B* 2002;357:667–81.
- Stegen JC, Lin X, Fredrickson JK *et al.* Quantifying community assembly processes and identifying features that impose them. *The ISME Journal* 2013;7:2069–79.
- Strange RN, Scott PR. Plant disease: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol* 2005;43:83–116.
- Stringlis IA, de Jonge R, Pieterse CMJ. The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell Physiol* 2019;60:1405–19.
- Strobel GA, Dirkse E, Sears J *et al.* Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 2021;147:2943–50.
- Stuefer JF, Gómez S, Mólken T van. Clonal integration beyond resource sharing: implications for defence signalling and disease transmission in clonal plant networks. *Evol Ecol* 2004;18:647–67.
- Sugiyama A, Bakker MG, Badri DV *et al.* Relationships between *Arabidopsis* genotype-specific biomass accumulation and associated soil microbial communities. *Botany* 2013;91:123–6.
- Surico G. Scanning Electron Microscopy of Olive and Oleander Leaves Colonized by *Pseudomonas syringae* subsp. *Savastanoi*. *Journal of Phytopathology* 1993;138:31–40.
- Sutton S. Accuracy of Plate Counts. *Microbiology Topics* 2011;17:42–6.
- T-
- Tan J, Kerstetter JE, Turcotte MM. Eco-evolutionary interaction between microbiome presence and rapid biofilm evolution determines plant host fitness. *Nat Ecol Evol* 2021;5:670–6.



- Tancos MA, Chalupowicz L, Barash I *et al.* Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:6948–57.
- Teixeira PJP, Colaianni NR, Fitzpatrick CR *et al.* Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Current Opinion in Microbiology* 2019;49:7–17.
- Teixeira PJPL, Colaianni NR, Law TF *et al.* Specific modulation of the root immune system by a community of commensal bacteria. *PNAS* 2021;118, DOI: 10.1073/pnas.2100678118.
- Terrasson E. Identification of a molecular dialogue between developing seeds of *Medicago truncatula* and seedborne xanthomonads. *Journal of Experimental Botany* 2015;66:3737–52.
- Terrasson E, Darrasse A, Righetti K *et al.* Identification of a molecular dialogue between developing seeds of *Medicago truncatula* and seedborne xanthomonads. *Journal of Experimental Botany* 2015;66:3737–52.
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL *et al.* Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* 2016;1:e00028-16.
- Thiergart T, Durán P, Ellis T *et al.* Root microbiota assembly and adaptive differentiation among European *Arabidopsis* populations. *Nat Ecol Evol* 2020;4:122–31.
- Thomma BPHJ. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 2003;4:225–36.
- Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS *et al.* Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Soil* 1993;150:177–91.
- Tian Y, Zhao Y, Wu X *et al.* The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Mol Plant Pathol* 2015;16:38–47.
- Toju H, Peay KG, Yamamichi M *et al.* Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants* 2018;4:247–57.
- Torres-Cortés G. Functional Microbial Features Driving Community Assembly During Seed Germination and Emergence. *Frontiers in Plant Science* 2018a;9, DOI: 10.3389/fpls.2018.00902.
- Torres-Cortés G. Functional Microbial Features Driving Community Assembly During Seed Germination and Emergence. *Frontiers in Plant Science* 2018b;9, DOI: 10.3389/fpls.2018.00902.
- Torres-Cortés G, Bonneau S, Bouchez O *et al.* Functional Microbial Features Driving Community Assembly During Seed Germination and Emergence. *Frontiers in Plant Science* 2018;9, DOI: 10.3389/fpls.2018.00902.



- Torres-Cortés G, Garcia BJ, Compant S *et al.* Differences in resource use lead to coexistence of seed-transmitted microbial populations. *Sci Rep* 2019;9:6648.
- Trivedi P, Leach JE, Tringe SG *et al.* Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology* 2020;18:607–21.
- Truong QL, Cho Y, Barate AK *et al.* Mutation of *purD* and *purF* genes further attenuates *Brucella abortus* strain RB51. *Microb Pathog* 2015;79:1–7.
- Truyens S. The effects of the growth substrate on cultivable and total endophytic assemblages of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 2016;405:325–36.
- Tung SY, Kuo TT. Isolation and characterization of mutants of the citrus canker pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* that induce a distinct pattern of disease. *Can J Bot* 2000;78:1002–9.
- Turner P, Barber C, Daniels M. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Gen Genet* 1984;195:101–7.
- Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome. *Genome Biology* 2013;14:209.
- Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J *et al.* Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal* 2013;7:2248–58.

-U-

- Ushio M, Yamasaki E, Takasu H *et al.* Microbial communities on flower surfaces act as signatures of pollinator visitation. *Scientific Reports* 2015;5:1–7.

-V-

- Vacher C. The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2016;47:1–24.
- Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M *et al.* The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 2015;206:1196–206.
- Vannette RL. The Floral Microbiome: Plant, Pollinator, and Microbial Perspectives. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2020;51:null.
- Vannette RL, Fukami T. Historical contingency in species interactions: towards niche-based predictions. Wootton T (ed.). *Ecol Lett* 2014;17:115–24.
- Vannette RL, Fukami T. Dispersal enhances beta diversity in nectar microbes. *Ecology Letters* 2017;20:901–10.
- Vannier N, Agler M, Hacquard S. Microbiota-mediated disease resistance in plants. *PLOS Pathogens* 2019;15:e1007740.



- Vannier N, Mony C, Bittebiere A-K *et al.* A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome* 2018;6:79.
- Vanstraelen M, Benková E. Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2012;28:463–87.
- Vass M, Székely AJ, Lindström ES *et al.* Using null models to compare bacterial and microeukaryotic metacommunity assembly under shifting environmental conditions. *Sci Rep* 2020;10:2455.
- Vellend M. Conceptual Synthesis in Community Ecology. *The Quarterly Review of Biology* 2010;85:183–206.
- Verdier J, Leprince O, Buitink J. A physiological perspective of late maturation processes and establishment of seed quality in *Medicago truncatula* seeds. *The Model Legume Medicago Truncatula*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019, 44–54.
- Veyrier FJ, Boneca IG, Cellier MF *et al.* A Novel Metal Transporter Mediating Manganese Export (MntX) Regulates the Mn to Fe Intracellular Ratio and *Neisseria meningitidis* Virulence. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002261.
- Vicente JG, Holub EB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol Plant Pathol* 2013;14:2–18.
- Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 2005;16:123–32.
- Visca P, Imperi F, Lamont IL. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology* 2007;15:22–30.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 2009;47:177–206.
- Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 2012;10:828–40.
- Vorholt JA, Vogel C, Carlström CI *et al.* Establishing Causality: Opportunities of Synthetic Communities for Plant Microbiome Research. *Cell Host & Microbe* 2017;22:142–55.
- W-**
- Wadhwa N, Berg HC. Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 2021:1–13.
- Wagner MR. Prioritizing host phenotype to understand microbiome heritability in plants. *New Phytologist* 2021;232:502–9.
- Wagner MR, Lundberg DS, Coleman-Derr D *et al.* Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild *Arabidopsis* relative. *Klironomos J* (ed.). *Ecology Letters* 2014;17:717–26.



- Wagner MR, Lundberg DS, del Rio TG *et al.* Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications* 2016;7:12151.
- Walsh CM, Becker-Uncapher I, Carlson M *et al.* Variable influences of soil and seed-associated bacterial communities on the assembly of seedling microbiomes. *ISME J* 2021, DOI: 10.1038/s41396-021-00967-1.
- Walters WA, Jin Z, Youngblut N *et al.* Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018;115:7368–73.
- Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:611–47.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM *et al.* Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5261–7.
- Wang X, Wei Z, Yang K *et al.* Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato. *Nat Biotechnol* 2019;37:1513–20.
- Watanabe K, Yukuhiro F, Matsuura Y *et al.* IntraspERM vertical symbiont transmission. *PNAS* 2014;111:7433–7.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annual Review of Plant Biology* 2005;56:253–79.
- Wei Z, Jousset A. Plant Breeding Goes Microbial. *Trends in Plant Science* 2017;22:555–8.
- Wetmore KM. Rapid Quantification of Mutant Fitness in Diverse Bacteria by Sequencing Randomly Bar-Coded Transposons. *mBio* 2015;6, DOI: 10.1128/mBio.00306-15.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL *et al.* Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology* 2017;13:e1005595.
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* 2005;8:383–9.
- Williams PH. Black Rot: A Continuing. *Plant Dis* 1980;64:736.
- van der Wolf J, Kastelein P, da Silva Júnior TAF *et al.* Colonization of siliques and seeds of rapid cycling Brassica oleracea plants by Xanthomonas campestris pv. campestris after spray-inoculation of flower clusters. *European Journal of Plant Pathology* 2019, DOI: 10.1007/s10658-019-01668-4.
- van der Wolf JM, van der Zouwen PS, van der Heijden L. Flower infection of Brassica oleracea with Xanthomonas campestris pv. campestris results in high levels of seed infection. *European Journal of Plant Pathology* 2013;136:103–11.



Wright E S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal* 2016;8:352.

Wuest SB, Albrecht SL, Skirvin KW. Crop residue position and interference with wheat seedling development. *Soil and Tillage Research* 2000;55:175–82.

**-X-**

Xiong W, Song Y, Yang K *et al.* Rhizosphere protists are key determinants of plant health. *Microbiome* 2020;8:27.

Xu L, Naylor D, Dong Z *et al.* Drought delays development of the sorghum root microbiome and enriches for monoderm bacteria. *PNAS* 2018;115:E4284–93.

**-Y-**

Yang L, Danzberger J, Schöler A *et al.* Dominant Groups of Potentially Active Bacteria Shared by Barley Seeds become Less Abundant in Root Associated Microbiome. *Front Plant Sci* 2017;8, DOI: 10.3389/fpls.2017.01005.

Yang T, Wei Z, Friman V-P *et al.* Resource availability modulates biodiversity-invasion relationships by altering competitive interactions. *Environ Microbiol* 2017c;19:2984–91.

Yeoh YK, Dennis PG, Paungfoo-Lonhienne C *et al.* Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. *Nature Communications* 2017;8:1–9.

Yuan Z, Wang L, Sun S *et al.* Genetic and Proteomic Analyses of a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* purC Mutant Deficient in Purine Biosynthesis and Virulence. *Journal of Genetics and Genomics* 2013;40:473–87.

**-Z-**

Zachow C, Müller H, Tilcher R *et al.* Differences between the rhizosphere microbiome of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*—ancestor of all beet crops—and modern sugar beets. *Frontiers in Microbiology* 2014;5:415.

Zameer SU, Bilal M, Fazal MI *et al.* Foraging behavior of pollinators leads to effective pollination in radish *Raphanus sativus* L. *Asian J Agri & Bio* 2017;5:221–7.

Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P *et al.* The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *mBio* 2015;6, DOI: 10.1128/mBio.02527-14.

Zengerer V, Schmid M, Bieri M *et al.* *Pseudomonas orientalis* F9: A Potent Antagonist against Phytopathogens with Phytotoxic Effect in the Apple Flower. *Frontiers in Microbiology* 2018;9, DOI: 10.3389/fmicb.2018.00145.



- Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 2008;18:821–9.
- Zhai L, Xu L, Wang Y *et al.* Transcriptional identification and characterization of differentially expressed genes associated with embryogenesis in radish (*Raphanus sativus* L.). *Sci Rep* 2016;6:21652.
- Zhalnina K, Louie KB, Hao Z *et al.* Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nat Microbiol* 2018;3:470–80.
- Zhang J, Liu Y-X, Guo X *et al.* High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota. *Nat Protoc* 2021;16:988–1012.
- Zhao G, Ren Y, Ma H. Extraction and characterization of radish seed oils using different methods. *Trop J Pharm Res* 2017;16:165.
- Zhou J, Ning D. Stochastic Community Assembly: Does It Matter in Microbial Ecology? *Microbiol Mol Biol Rev* 2017;81, DOI: 10.1128/MMBR.00002-17.
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:723–35.



**Titre :** Décryptage des processus d'assemblage du microbiote des graines dans le but de limiter la transmission d'agents pathogènes

**Mots clés :** Transmission par la graine, Microbiote des plantes, Processus écologiques, Compétition par exploitation, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

**Résumé :** La graine est le point de départ de l'assemblage des communautés associées au microbiote des plantes et va promouvoir le bon développement et la santé des plantes. L'étude de la structure du microbiote pendant le développement des graines de haricot et de radis a révélé que la *Sélection* était le principal processus écologique impliqué dans l'assemblage des communautés. Les facteurs de l'hôte et de l'environnement conduisent à la sélection d'un taxon dominant dont l'identité peut varier d'une graine à l'autre au sein de la même plante, mais aussi au cours du développement de la graine. La transmission de ces taxons dominants aux plantules n'est cependant pas systématique.

L'analyse des déterminants génétiques bactériens impliqués dans la transmission aux plantules de l'agent phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) a révélé que la biosynthèse des purines était importante pour coloniser cet habitat. Enfin, la transmission de *Xcc* par les graines peut être limitée par une souche de *Pseudomonas* isolée de graines, grâce à sa capacité à produire une pyoverdine atypique lors de l'interaction avec cet agent phytopathogène. En conclusion, ces résultats constituent un premier pas vers l'utilisation de la graine comme vecteur d'organismes bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes.

**Title :** Deciphering seed microbiota assembly processes for limiting seed transmission of pathogen

**Keywords :** Seed Transmission, Plant Microbiota, Ecological processes, Exploitative competition, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

**Abstract :** Seed is the starting point of community assembly of the plant microbiota that supports plant growth and health. Investigation of microbiota structure during development of bean and radish seeds revealed that *Selection* was the major ecological process involved in community assembly. Host and environmental filtering drove the selection of one dominant taxon, whose identity varied not only between seeds of the same plant but also during the seed developmental stages. Seedling transmission of these dominant taxa was far from being systematic.

Analysis of the bacterial genetic determinants involved in seedling transmission of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) revealed that purine biosynthesis was key factor to colonize this habitat. Seed transmission of *Xcc* can be limited by a seed-borne *Pseudomonas* strain that produced an atypical pyoverdine when interacting with this phytopathogenic agent. Overall these results pave the way towards the use of seeds as vectors of beneficial organisms for plant growth and health.