

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

LE RÔLE DES MIARNS AYANT TRAIT À L'ACQUISITION DES RESSOURCES AZOTÉES PAR LES PLANTES

par

Jessica Dozois

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du Jury et	Richard Villemur
examineur interne	INRS-AFSB
Examineur externe	Joann Whalen McGill University
Directeur de recherche	Étienne Yergeau INRS-AFSB
Co-directeur de recherche	Julien Tremblay CNRC

DÉDICACES

Ce travail est dédié aux personnes à la quête d'un avenir plus écologique, sain et juste.

REMERCIEMENTS

Merci à mes directeurs de recherche Étienne Yergeau et Julien Tremblay pour leur incroyable investissement dans mon projet. Je suis choyée d'être supervisée par un duo aussi talentueux, enthousiaste et compétent.

Merci à mes collègues de l'ECOBIO (Rennes, France) Abdelhak El Amrani, Cécile Monard, Virginie Dufour et Harriet Middleton. Vous êtes une équipe formidable et j'ai hâte de poursuivre mon parcours académique sur les miARNs de plantes en collaboration avec vous durant mon doctorat.

Merci au Labo Yergeau. Spécialement à Eugénie, Itumeleng, Liliana, Sara, Asmaâ, Ruth, Anne, Pranav, Hamed et aux nouvelles additions Emmy, Jason, Mariane et Chary. Quand je pense à vous je ne peux m'empêcher de sourire. Vous êtes merveilleuses et merveilleux. Merci à Philip Loranger pour les précieux conseils et dépannages liés à mes petits fragments d'ADN et d'ARN.

Merci à Alec et à Webster (parfois surnommé Webster Monster) de faire briller mes journées (oui oui même toutes ces journées interminables où j'ai véritablement sous-estimé la durée de mes manipulations). La vie est réellement plus belle avec vous à mes côtés.

Merci à mes parents et à ma sœurette de m'avoir transmis et de continuer à alimenter mes nombreuses passions. Merci pour votre patience, expertise, amitié et amour. Merci de m'avoir laissé et de me laisser être moi (je sais que vous avez accumulé des rides du sourire en conséquence ;) et que vous êtes, grâce à moi, des expert.es dans le domaine du roulement des yeux). Je vous aime sincèrement et complètement.

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

L'azote est l'élément le plus limitant à la croissance des plantes. Afin d'acquérir l'azote, les plantes sont en compétition avec les microorganismes du sol. Les micro-ARNs (miARNs) sont un groupe de molécules pouvant potentiellement interférer avec l'utilisation microbienne d'azote, en revanche les miARNs sont absents du paradigme plante-microbiote actuel. Nous émettons l'hypothèse que les miARNs sont des joueurs essentiels parmi les interactions plante-microbiote et qu'ils sont relâchés par les plantes en présence des acides aminés. Notre plan expérimental a été composé de 5 blocs où 2 plantes modèles et des témoins non-plantés ont été confrontés à trois régimes d'azote (organique, inorganique et aucun ajout) pour 21 jours. Le séquençage du microbiote démontre une réponse marquée de la communauté bactérienne aux fertilisants tandis que la communauté fongique y répond moins. Les résultats de séquençage des petits ARNs révèlent 48 miARNs répondant significativement aux régimes azotés dont 11 sont relâchés à l'extérieur des racines de la plante. Les analyses de cibles suggèrent que 10 des 11 miARNs inhibent des gènes microbiens liés au cycle de l'azote tels que des transporteurs, des réductases (NO_2^- et N_2O), des peptidases et des protéases. L'abondance des 11 miARNs a également été corrélée avec l'abondance des communautés microbiennes. En bref, nos résultats impliquent une réponse individuelle de certains miARNs en fonction de chaque régime de fertilisation. Ainsi, certains miARNs peuvent permettre aux plantes d'acquérir de l'azote de manière compétitive dans plusieurs contextes écologiques tels que des conditions pauvres en azote, des sols riches en matière organique, des terres fertilisées chimiquement, etc. D'autre part, l'exsudation de miARNs dans la rhizosphère afin de moduler les activités microbiennes est possiblement répandue au sein du règne végétal.

Mots-clés : miARNs, azote, microbiote, interactions, microorganismes, rhizosphère, plantes, sol

ABSTRACT AND KEYWORDS

Nitrogen is the most limiting element for plants. To acquire nitrogen, plants need to compete with soil microorganisms. Plant micro ribonucleic acids (miRNAs) are a group of molecules that can potentially interfere with nitrogen use of soil microorganisms, alas they are missing from the plant-microbiome paradigm. We hypothesize that miRNAs are key players in plant-microbe interactions, and that they are especially released by plants into the rhizosphere in the presence of amino acids. Our experimental design included 5 blocks where 2 plants (*Arabidopsis* and *Brachypodium*) were grown alongside unplanted controls under three nitrogen regimes (organic, inorganic and no added nitrogen) for 21 days. Nucleic acids were extracted and sequenced for microbiome and small RNA profiling. The bacterial community was strongly influenced by the fertilizer treatments whereas the fungal community was less responsive. Biostatistics revealed 48 miRNAs with significant responses to nitrogen fertilization, 11 of which were only found in the rhizosphere or bulk soil of planted pots. Target prediction analyses of these 11 miRNAs showed that 10 of them potentially affected important microbial nitrogen transporters or genes involved in the nitrogen cycle such as nitrite reductases, nitrous oxide reductases, peptidases and proteases. The abundances of the 11 miRNAs were correlated with bacterial abundances to identify possibly responding taxa. In brief, our findings imply that certain plant miRNAs have a unique response to different nitrogen availability conditions. Therefore, certain miRNAs may enable plants to competitively acquire nitrogen in a variety of contexts: some in low nitrogen conditions, others in rich organic matter soil, others in chemically fertilized lands, etc. Lastly, the release of miRNAs into the rhizosphere to modulate microbial activities is possibly a widespread phenomenon within the plant kingdom.

Key words: miRNAs, nitrogen, microbiome, interactions, microorganisms, rhizosphere, plants, soil

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	X
1 INTRODUCTION	1
1.1 UNE RÉVOLUTION VERTE FERTILISANT LA CRISE ENVIRONNEMENTALE.....	1
1.2 L'AZOTE ET SON CYCLE VICIEUSEMENT ESSENTIEL POUR LES PLANTES.....	2
1.2.1 L'AZOTE INORGANIQUE	2
1.2.2 L'AZOTE ORGANIQUE	7
1.3 LA COHABITATION DYNAMIQUE ENTRE LES PLANTES ET LES MICROORGANISMES DU SOL.....	12
1.3.1 LES TACTIQUES MICROBIENNES INFLUENÇANT LES PLANTES.....	12
1.3.2 LES STRATÉGIES DES PLANTES POUR MODULER LE CORTÈGE MICROBIEN	16
1.4 UN SECRET BIEN GARDÉ : LE RELÂCHEMENT DES MICRO-ARNs PAR LES PLANTES	19
2 HYPOYTHÈSES ET OBJECTIFS	25
3 MÉTHODOLOGIE	29
3.1 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	32
3.2 L'EXTRACTION D'ARN ET LE SÉQUENÇAGE	32
3.3 ÉTIQUETAGE TAXONOMIQUE DES AMPLICONS (ARNr 16S ET ITS2).....	33
3.5 MESURE DU PH DU SOL ÉLOIGNÉ	36
3.6 ANALYSES STATISTIQUES	37
4 RÉSULTATS.....	41
4.1 ANALYSES STATISTIQUES DU PROFIL GÉNÉRAL DES miARNs.....	41
4.2 IDENTIFICATION DES miARNs RÉPONDANT SIGNIFICATIVEMENT AUX FERTILISANTS.....	45
4.3 CARACTÉRISATION DU PROFIL GÉNÉRAL DU MICROBIOTE.....	50
4.4 TAXONS MICROBIENS CORRÉLÉS AUX miARNs RÉPONDANT SIGNIFICATIVEMENT AUX FERTILISANTS	55
5 DISCUSSION.....	57
5.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DU <i>MIRNABOLOME</i>	57
5.2 LES miARNs RÉPONDANT À L'AZOTE ET LEUR INFLUENCE SUR LES MICROORGANISMES DU SOL	58
5.3 PROFIL GÉNÉRAL DU MICROBIOTE	63
5.4 CORRÉLATIONS ENTRE LES miARNs POTENTIELLEMENT RELÂCHÉS PAR LES PLANTES ET LES TAXONS MICROBIENS	63

6 CONCLUSION	67
ANNEXE : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	69
BIBLIOGRAPHIE.....	87

LISTE DES FIGURES

1 INTRODUCTION	1
FIGURE 1.1: IMPORTANCE DU PROCÉDÉ HABER-BOSCH POUR SUPPORTER LA CROISSANCE DÉMOGRAPHIQUE MONDIALE.....	4
FIGURE 1.2 : LA TRANSFORMATION MICROBIENNE D'AZOTE INORGANIQUE DANS LE SOL ET LA VOLATILISATION.....	6
FIGURE 1.3 : STRUCTURE DU PEPTIDOGLYCANE COMPOSANT LA PAROI DES BACTÉRIES GRAM –.....	8
FIGURE 1.4 : LA MINÉRALISATION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE EN AZOTE INORGANIQUE.....	9
FIGURE 1.5 : RÉSUMÉ DES EFFETS DES PHYTOHORMONES SUR LA CROISSANCE DES PLANTES.....	13
FIGURE 1.6 : ÉCHANGES ENTRE UNE PLANTE ET LES MICROMYCÈTES ENDOMYCORHIZIENS ARBUSCULAIRES.....	14
FIGURE 1.7 : BIOGENÈSE DES MIARNS VÉGÉTAUX.	20
FIGURE 1.8 : ÉTUDE DE CAS DE L'UTILITÉ DES MVBS ET EVS DANS LA RÉSISTANCE CONTRE UN OOMYCÈTE.....	23
2 HYPOYTHÈSES ET OBJECTIFS	25
FIGURE 2.1 : SCHÉMATISATION DES INTERACTIONS PLANTE-MICROBIOTE VIA LES MIARNS.	25
3 MÉTHODOLOGIE	29
FIGURE 3.1 : SCHÉMATISATION D'UN BLOC DE L'EXPÉRIENCE OÙ LES 9 COMBINAISONS DE FERTILISATION-TYPE DE SEMIS SE TROUVENT.....	30
FIGURE 3.2 : UN DES BLOCS ÉCHANTILLONNÉS LORS DE L'EXPÉRIENCE.....	31
FIGURE 3.3 : ÉCHANTILLONNAGE DES COMPARTIMENTS.....	31
FIGURE 3.4 : SCHÉMATISATION DES 3 MÉTHODES UTILISÉES POUR IDENTIFIER LES MIARNS.....	36
4 RÉSULTATS.....	41
FIGURE 4.1 : ANALYSES EN COORDONNÉES PRINCIPALES (ACOPs) SUR LA DISTANCE HELLINGER DES MIARNS IDENTIFIÉS À PARTIR DE LA MÉTHODE <i>DE NOVO</i>.	42
FIGURE 4.2 : ARBRE DE RÉGRESSION MULTIVARIABLE (ARM) GÉNÉRÉ À PARTIR DES ABONDANCES RELATIVES DES MIARNS (500 ESSAIS).....	43
FIGURE 4.3 : PROVENANCE DES MIARNS TROUVÉS À L'EXTÉRIEUR DES RACINES ENTRE LES POTS PLANTÉS AVEC <i>A. THALIANA</i> ET <i>B. DISTACHYON</i>.	48
FIGURE 4.4 : GENRES BACTÉRIENS CIBLÉS PAR AU MOINS 2 MIARNS RÉPONDANT AUX FERTILISANTS.	49
FIGURE 4.5 : FONCTIONS BACTÉRIENNES GÉNÉRALES CIBLÉES PAR LES MIARNS RÉPONDANT AUX FERTILISANTS.	50

FIGURE 4.6 : ANALYSES EN COORDONNÉES PRINCIPALES (ACOPs) SUR LA DISTANCE HELLINGER DES ABONDANCES RELATIVES DES ASVS FORMANT LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES.....	52
FIGURE 4.7 : ARBRES DE RÉGRESSIONS MULTIVARIABLES (ARMs) GÉNÉRÉS À PARTIR DES ABONDANCES RELATIVES DU SÉQUENÇAGE D'AMPLICONS (100 ESSAIS).	53
FIGURE 4.8 : PROPORTION DE LA VARIANCE DU PROFIL MICROBIEN EXPLIQUÉE PAR LES DIFFÉRENTES VARIABLES.....	54
ANNEXE : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	69
FIGURE S1.1: LES 5 BLOCS RETENUS POUR LE SÉQUENÇAGE DES AMPLICONS ET DES MIARNS.....	69
FIGURE S1.2 : GENRES BACTÉRIENS CIBLÉS PAR LES MIARNS RÉPONDANT AUX FERTILISANTS ET RELÂCHÉS À L'EXTÉRIEUR DES RACINES.	77

LISTE DES TABLEAUX

1 INTRODUCTION	1
TABLEAU 1.1 : POURCENTAGE D'AZOTE COMPOSANT LES FERTILISANTS CHIMIQUES COURANTS.....	11
TABLEAU 1.2 : LISTE DE QUELQUES TAXONS FAVORISANT LA CROISSANCE DES PLANTES.....	15
4 RÉSULTATS.....	41
TABLEAU 4.1 : QUANTIFICATION DES MIARNS D'A. THALIANA ET B. DISTACHYON SELON LES 3 DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS ÉCHANTILLONNÉS.....	42
TABLEAU 4.2 : RÉSULTATS DES PERMANOVAS EFFECTUÉES SUR LES ABONDANCES RELATIVES DES MIARNS (9999 PERMUTATIONS).....	44
TABLEAU 4.3 : CIBLE DES MIARNS RÉAGISSANT SIGNIFICATIVEMENT AUX TRAITEMENTS EXPÉRIMENTAUX.....	46
TABLEAU 4.4 : ABONDANCES RELATIVES DES MIARNS SIGNIFICATIVEMENT CORRÉLÉES AU PH.....	47
TABLEAU 4.5: RÉSULTATS D'UNE ANOVA EFFECTUÉE SUR LES DONNÉES DE PH DU SOL ÉLOIGNÉ.....	55
TABLEAU 4.6 : RÉSULTATS D'UNE PERMANOVA EFFECTUÉE SUR LES ABONDANCES RELATIVES DE LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE ET D'ARCHÉES POUR VÉRIFIER SI LE PH PEUT EXPLIQUER LE CHANGEMENT COMMUNAUTAIRE.....	55
TABLEAU 4.7 : RÉSULTATS D'UNE PERMANOVA EFFECTUÉE SUR LES ABONDANCES RELATIVES DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE POUR VÉRIFIER SI LE PH PEUT EXPLIQUER LE CHANGEMENT COMMUNAUTAIRE.....	55
ANNEXE : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	69
TABLEAU S1.1: PORTION DU TABLEAU DES ABONDANCES RELATIVES TRANSFORMÉES (HELLINGER) DES RÉSULTATS DE SÉQUENÇAGE DES MIARNS.....	70
TABLEAU S1.2 : PORTION DU TABLEAU DES ABONDANCES RELATIVES TRANSFORMÉES (HELLINGER) DES RÉSULTATS DE SÉQUENÇAGE DES TRANSCRITS DU GÈNE ARNR 16S POUR LA COMMUNAUTÉ BACTÉRIENNE.....	70
TABLEAU S1.3: PORTION DU TABLEAU DES ABONDANCES RELATIVES TRANSFORMÉES (HELLINGER) DES RÉSULTATS DE SÉQUENÇAGE DES TRANSCRITS DE LA RÉGION ITS2 POUR LA COMMUNAUTÉ DES MICROMYCÈTES.....	70
TABLEAU S1.4: PORTION DU TABLEAU DES PRÉSENCE-ABSENCE DES RÉSULTATS DE SÉQUENÇAGE DES MIARNS. EN COLONNES SE TROUVENT LES IDENTIFIANTS DE 10 MIARNS.....	71
TABLEAU S1.5: MOYENNE DU PH DU SOL ÉLOIGNÉ.....	72
TABLEAU S1.6 : ABONDANCES RELATIVES DES MIARNS RÉPONDANT SIGNIFICATIVEMENT AUX FERTILISANTS.....	73
TABLEAU S1.7: SÉQUENCES DES MIARNS RÉPONDANT SIGNIFICATIVEMENT AUX FERTILISANTS.....	76
TABLEAU S1.8 : RÉSULTATS D'UNE PERMANOVA EFFECTUÉE SUR LES ABONDANCES RELATIVES DES MIARNS POUR VÉRIFIER SI LE PH PEUT EXPLIQUER LE CHANGEMENT GLOBAL.....	76

TABLEAU S1.9 : RÉSULTATS D'UNE PERMANOVA EFFECTUÉE SUR LES ABONDANCES RELATIVES DES MIARNS POUR VÉRIFIER SI LE PH PEUT EXPLIQUER LE CHANGEMENT GLOBAL.	76
TABLEAU S1.10 : RÉSULTATS DES PERMANOVAS EFFECTUÉES SUR LES ABONDANCES RELATIVES DU SÉQUENÇAGE D'AMPLICONS (9999 PERMUTATIONS).....	78
TABLEAU S1.11 : TAXONS BACTÉRIENS CORRÉLÉS AUX MIARNS RÉPONDANT SIGNIFICATIVEMENT AUX FERTILISANTS..	79
TABLEAU S1.12 : TAXONS FONGIQUES CORRÉLÉS AUX MIARNS RÉPONDANT SIGNIFICATIVEMENT AUX FERTILISANTS..	84

1 INTRODUCTION

1.1 Une révolution verte fertilisant la crise environnementale

Le contexte socio-climatique actuel menace notre sécurité alimentaire. Déjà que le secteur agricole peine à répondre à la pression démographique grimpanche, les producteurs doivent affronter les défis imposés par une crise environnementale oppressante : intempéries, phytopathogènes émergents ou introduits, érosion du sol, perte de biodiversité, etc. (Yongbo, Xubin & Junsheng, 2015; Nearing, Pruski & O'Neal, 2004; Yang *et al.*, 2003). Historiquement, la révolution verte, s'étirant entre 1966 et 1985, a promis une intensification agricole générant des rendements abondants pouvant diminuer la pauvreté dans les pays en développement. Cette intensification a permis d'accroître les rendements par hectare et donc d'épargner plusieurs terres et leurs services écosystémiques d'une transformation agricole. Au cœur de cette révolution s'est trouvée la génétique : l'optimisation des variétés cultivées par le Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR) (Pingali, 2012). La population a pu accroître leurs apports caloriques quotidiens grâce à la sélection des cultivars les plus productifs. En revanche, l'optimisation des rendements a été corrélée négativement à la concentration protéique des récoltes (Simmonds, 1995). Les incitations des pratiques monoculturelles ont ainsi en partie résorbé la faim de la population au coût de la perte d'une diète plus diversifiée et nutritive. C'est le cas en Inde où la culture du riz a dominé le secteur agricole aux dépens des cultures de céréales secondaires telles que le millet et le sorghum : des cultures plus protéiques, riches en fer, plus résilientes aux intempéries et moins émettrices de gaz à effet de serre (Davis *et al.*, 2019). La maximisation des rendements a également entraîné une valorisation des activités d'irrigations, d'applications de fertilisants et de pulvérisations de pesticides. En fait, alors que la production de grains a multiplié d'un facteur de 2.32 entre 1965 et 1992, en Inde, l'utilisation d'engrais chimiques a connu un facteur d'intensification de 41.61 entre 1960 et 1993 (Singh, 2000). Globalement, 62.2% des pays ont été en mesure d'accroître leur production céréalière de 1961 à 2010 (Yongbo, Xubin & Junsheng, 2015). Parmi cette proportion se trouvent les trois plus grands producteurs : la Chine, les États-Unis et l'Inde. L'augmentation de la consommation de fertilisants par ces trois puissances agricoles a été respectivement +43% (393.96 kg/ha à 565.25 kg/ha) +15% (119.56 kg/ha à 137.60 kg/ha) et +57% (105.18 kg/ha à 165.12 kg/ha) entre 2002 et 2014 (Indicators, 2017). La relation entre le rendement et l'ajout de fertilisants n'est plus aussi parfaite. Malgré la performance des variétés génétiques sélectionnées durant la Révolution Verte, une diminution de la capacité des cultures à assimiler efficacement l'azote peut être constatée. Plus concrètement, en 1960 les cultures avaient une efficacité d'environ 76 mégatonnes de

céréales/mégatonnes de fertilisants alors qu'à partir de 1980 cette efficacité a stagné à 26 mégatonnes de céréales/mégatonnes de fertilisants (Tilman *et al.*, 2002). Ces chiffres reflètent une fertilisation excédentaire encouragée machinalement par le secteur agricole.

Cette utilisation intensive de fertilisants en agriculture moderne est en partie expliquée par les lacunes englobant les processus biogéochimiques, écologiques et interrègnes caractérisant les plantes et les microorganismes du sol. Vis-à-vis ce manque de connaissances, la solution facile à entreprendre est d'assurer que les cultures aient tous les nutriments nécessaires pour générer des rendements abondants de haute qualité. Le macro-nutriment le plus limitant à la croissance des plantes est l'azote. Cet élément compose l'ADN, les protéines et la chlorophylle : une molécule essentielle au déroulement de la photosynthèse. Plusieurs études attestent que l'application d'engrais azotés contribuent à augmenter non seulement les rendements, mais également la qualité du soya (Gai, Zhang & Li, 2017; Osborne & Riedell, 2006), du blé (Yu *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2018) et du maïs (Song *et al.*, 2019).

Néanmoins, l'utilisation déraisonnable d'engrais azotés est problématique surtout à cause de la compétition des microorganismes pour les ressources azotées du sol. En effet, chaque unité d'azote appliquée a environ 40% de chance d'être assimilée par la plante, puisque les microbes du sol utilisent les formes inorganiques d'azote comme source d'énergie ou comme accepteur d'électron, en plus de les utiliser pour leur nutrition (Good & Beatty, 2011). Ceci peut mener à la transformation d'ammonium (NH_4^+) en nitrate (NO_3^-), une molécule beaucoup plus mobile et responsable de l'eutrophisation des cours d'eau, car le NO_3^- est moins bien retenu par les particules du sol qui sont chargées négativement (Smith, 2006; Carpenter *et al.*, 1998). Ou encore à la transformation du nitrate en intermédiaire gazeux, dont le protoxyde d'azote (N_2O), un gaz à effet de serre 300 fois plus puissant que le dioxyde de carbone (CO_2) (Tian *et al.*, 2020; Griffis *et al.*, 2017). La manipulation des activités microbiennes du sol pourrait être une solution favorisant l'utilisation d'azote par les plantes.

1.2 L'azote et son cycle vicieusement essentiel pour les plantes

1.2.1 L'azote inorganique

La fixation d'azote atmosphérique

L'azote sous forme de diazote gazeux (N_2) représente 78% de l'atmosphère. Quoique l'azote atmosphérique s'avère abondant, sous cette forme, il est inaccessible aux plantes. Celles-ci dépendent donc des microorganismes symbiotiques ou à proximité pour leur fournir l'azote en continu. Un

processus nommé fixation permet de convertir le N_2 en ammoniac (NH_3) un intermédiaire clé. Les microorganismes en mesure de fixer l'azote possède l'enzyme nitrogénase et sont connus sous le nom des diazotrophes. Les diazotrophes libres se composent essentiellement de bactéries dans le genre *Azotobacter* ainsi que d'archées du phylum *Euryarchaeota* (Boyd & Peters, 2013). Certaines plantes telles que les légumineuses, soit la famille des fabacées, et les angiospermes actinorhiziennes ont une relation symbiotique avec respectivement des bactéries diazotrophes du genre *Rhizobium* et *Frankia* situées dans leurs nodules racinaires (Andrews & Andrews, 2017; Battenberg *et al.*, 2017).

L'ammoniac doit ensuite être ionisé en ammonium (NH_4^+) pour être assimilé par les plantes. Cette ionisation se produit de l'ammoniac en ammonium et vice versa selon le pH du sol. La fixation peut également se produire naturellement par des coups d'éclairs (Hill, Rinker & Wilson, 1980). Les éclairs transforment l'ammoniac en ammonium et en nitrate : deux formes assimilables par les plantes. L'intégration d'azote au sein d'un organisme se nomme immobilisation.

Enfin, un procédé industriel est en mesure de fixer le diazote atmosphérique en ammoniac par une méthode mise au point par Fritz Haber et Carl Bosch au début des années 1900 (Erisman *et al.*, 2008). Une augmentation de 30 à 50% des rendements agricoles peut être attribuée au procédé Haber-Bosch (Stewart *et al.*, 2005). L'industrialisation de la fixation d'azote a pu soutenir la croissance démographique mondiale (Figure 1.1) et aujourd'hui 1 atome d'azote sur 2 découle de ce procédé (Erisman *et al.*, 2008). La réaction Haber-Bosch demeure néanmoins une méthode énergivore consommant 1-2% de l'énergie globale et produisant 1.44% des émissions de CO_2 (Chen *et al.*, 2018b) en plus de contribuer à l'eutrophisation, la contamination des eaux, les pluies acides et la perte de biodiversité. Récemment, une nouvelle procédure a été développée pour contrer les aspects néfastes de la fixation Haber-Bosch (Ashida *et al.*, 2019).

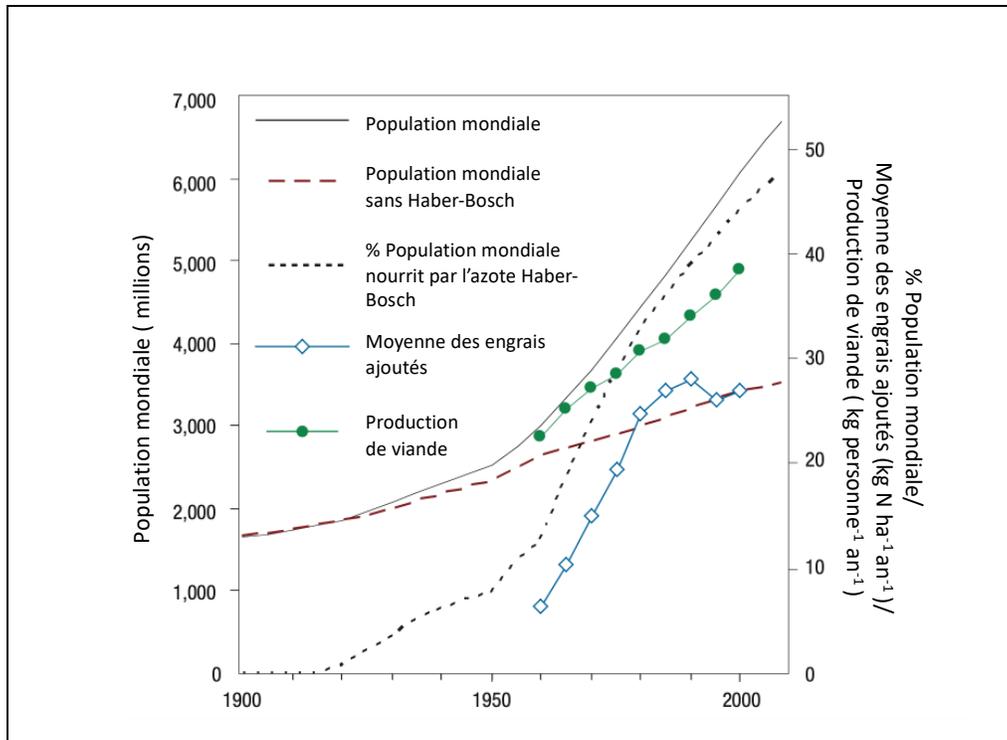
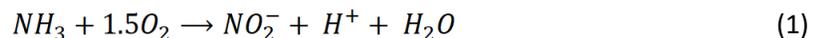


Figure 1.1: Importance du procédé Haber-Bosch pour supporter la croissance démographique mondiale. Adaptation de la Figure 1 publiée par Erismann et al. 2008. L'augmentation de la fertilisation azotée par le procédé Haber-Bosch constitue l'exemple parfait de l'anthropisation du cycle de l'azote.

La nitrification et le lessivage y découlant

La nitrification est la réaction où l'ammoniac est transformé en nitrite et par la suite en nitrate.



La première étape de la nitrification est catalysée par les bactéries et les archées pouvant oxyder l'ammoniac (Ammonia-oxidizing microorganisms AOM) qui sont dotés d'une monooxygénase d'ammoniac (AMO) et d'une oxydoréductase d'hydroxylamine (HAO) (1). Le genre bactérien souvent associé à la conversion d'ammoniac en nitrite dans les sols est *Nitrosomonas* alors que les taxons archéens sont *Thaumarchaeota* incluant *Nitrosopumilus* et *Nitrososphaera* (Jin, Zhang & Yan, 2010; He et al., 2018). La seconde étape est menée par les bactéries possédant des enzymes appelées nitrite oxydoréductase (NOX/NXR) tels que les genres *Nitrobacter* et *Nitrosolobus* (Levy-Booth, Prescott &

Grayston, 2014) (2). La nitrification est une réaction endothermique et représente donc une source énergétique pour les microorganismes impliqués (Dixit, 2019). Effectivement, les organismes impliqués sont généralement chimiolithoautotrophes et obtiennent le carbone en fixant le CO₂ en utilisant, entre autres, l'énergie produite par la nitrification (Dang & Chen, 2017). Quelques microorganismes peuvent effectuer les deux étapes de la nitrification (Complete Ammonia Oxidation : COMAMMOX) tels que certains membres appartenant au genre *Nitrospira* (Daims et al., 2015). Certaines bactéries et espèces fongiques hétérotrophes peuvent également contribuer à la nitrification, quoique la réaction se produit plus lentement. À savoir, la nitrification accroît la mobilité de l'azote dans le sol et mène à sa perte par le lessivage dans les eaux sous-terraines et par la dénitrification. En fait, les particules du sol, surtout la fraction argileuse, sont généralement chargées négativement et retiennent davantage les cations (l'ammonium NH₄⁺) et moins les anions (le nitrate NO₃⁻). Par ailleurs, l'assimilation de l'ammonium est plus économique d'un point de vue énergétique puisque contrairement au nitrate, l'ammonium peut être immédiatement utilisé pour synthétiser des acides aminés (Haynes & Goh, 1978).

La dénitrification, la DNRA et l'ANAMMOX

La dénitrification représente le processus qui permet de boucler la boucle en retransformant le nitrate en gaz (NO, N₂O ou N₂) (voir Figure 1.2 pour une schématisation du cycle inorganique de l'azote). Elle se déroule en condition d'anaérobie où l'oxygène se fait rare incluant des micro-sites anaérobies à proximité de la surface du profil de sol. Dans ces conditions, les dénitrificateurs utilisent le nitrate comme accepteur d'électron final à la place de l'oxygène. Plus de 60 genres de microorganismes, incluant des archées, des bactéries et des mycètes, peuvent contribuer à la dénitrification (Tanimoto *et al.*, 1992; Philippot, Hallin & Schloter, 2007). Certains microorganismes effectuent la dénitrification complète jusqu'au diazote alors que d'autres s'arrêtent au protoxyde d'azote. Le cycle de l'azote se complique davantage étant donné que certaines espèces peuvent contribuer à plus d'une transformation chimique. Par exemple, être en mesure de dénitrifier et nitrifier (Shaw *et al.*, 2006).

La DNRA (*Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium*) débute par la réduction du nitrate en nitrite grâce à une nitrate réductase. Ensuite, le nitrite est réduit par la nitrite réductase NRF, une enzyme caractéristique des microorganismes effectuant la DNRA appartenant à la classe Gammaproteobacteria (Papasprou *et al.*, 2014; Luvizotto *et al.*, 2019). Comme son nom l'indique, la DNRA permet de convertir le nitrate en ammonium et représente donc un processus qui retient l'azote biodisponible dans le sol. Semblables à la dénitrification, les bactéries effectuant la DNRA respirent le nitrate.

L'ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) implique des espèces appartenant au phylum bactérien Planctomycetes (Kuenen, 2008). La transformation de l'ammonium et du nitrite en diazote contribue, comme la dénitrification, à la perte d'azote dans le sol. La répartition du nitrate entre les processus de dénitrification, DNRA et ANAMMOX semble dépendre des propriétés du substrat, telles que le ratio de nitrate et de nitrite, le pH, le ratio C :N, la concentration en sulfures et le type et la complexité du donneur d'électron (van den Berg *et al.*, 2017; Kraft *et al.*, 2014). Néanmoins, le taux de DNRA dans le sol peut excéder le taux de dénitrification (Rütting *et al.*, 2008; Friedl *et al.*, 2018). Cela dit, une étude menée à l'Université de Melbourne illustre l'instabilité du taux de DNRA lors de l'ajout d'engrais azotés (150 kg N ha⁻¹ pendant 75 jours). Cet ajout d'azote a réduit le taux de DNRA de >16% dans trois types de sol, impliquant que le nitrate était 40-50% moins réduit par la DNRA que par la dénitrification (Pandey *et al.*, 2018). Les taux de réductions du nitrate ont été semblables dans les sols sans ajout d'azote, puis la perte d'azote par l'ANAMMOX s'avérait minimale. Il faut donc retenir que l'ajout d'engrais azotés peut défavoriser le recyclage d'azote biodisponible.

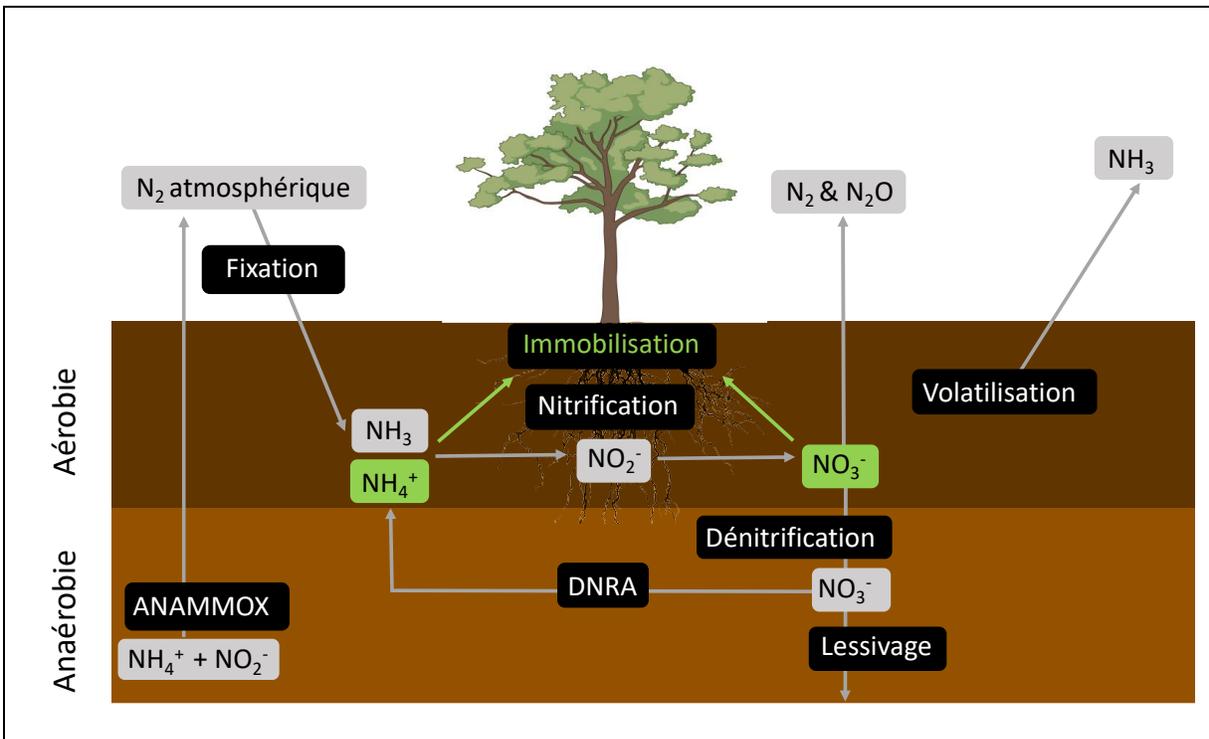


Figure 1.2 : La transformation microbienne d'azote inorganique dans le sol et la volatilisation.
 Les formes inorganiques assimilables par les plantes (l'ammonium (NH₄⁺) et le nitrate (NO₃⁻)) se trouvent dans les boîtes vertes. Les autres formes d'azote se trouvent dans les boîtes grises. Le nom des processus chimiques se trouvent dans les boîtes noires.

1.2.2 L'azote organique

La minéralisation et l'immobilisation d'azote organique

Il suffit de penser à la décomposition ou à l'application de fumier dans les champs agricoles, pour comprendre que l'azote organique joue également un rôle non-négligeable dans le cycle de l'azote. Par ailleurs, l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) un des fertilisants les plus utilisés, est une forme d'azote organique. La croissance et la mortalité microbienne, intitulées boucle microbienne, contribuent au fait que le sol regorge de molécules organiques riches en azote provenant de matières en décomposition ou d'activités métaboliques, telles que des polymères (protéines, chitine, ADN, peptidoglycane), des oligomères (peptides) et des monomères (acides aminés, sucres aminés et acides nucléiques). La majorité d'azote organique dans le sol est constituée de protéines, de chitine, de peptidoglycane, d'acides aminés, de sucres aminés (glucosamine, galactosamine, mannosamine et acide muramique) et de composés azotés hétérocycliques (purine et pyrimidine) (Schulten & Schnitzer, 1997; Li *et al.*, 2014). Les protéines sont la forme d'azote organique la plus importante dans les sols et découlent soit de la mortalité cellulaire (protéines détritiques), des protéines actives telles que les protéines à la surface des microorganismes ou d'enzymes extracellulaires (Canarini *et al.*, 2019; Rillig *et al.*, 2007). Le sucre aminé prépondérant dans le sol (60% des sucres aminés du sol), le N-acétylglucosamine, s'avère le seul monomère de la chitine : un polymère retrouvé dans la paroi des cellules fongiques et l'exosquelette des crustacés et insectes, et un des deux monomères constituant la paroi bactérienne (Joergensen, 2018). L'autre monomère du peptidoglycane (Figure 1.3) est l'acide N-acétylmuramique représentant 7% de la proportion de sucres aminés du sol (Joergensen, 2018). Il est estimé que 80% des ressources azotées organiques du sol sont de provenance microbienne (Simpson *et al.*, 2007).

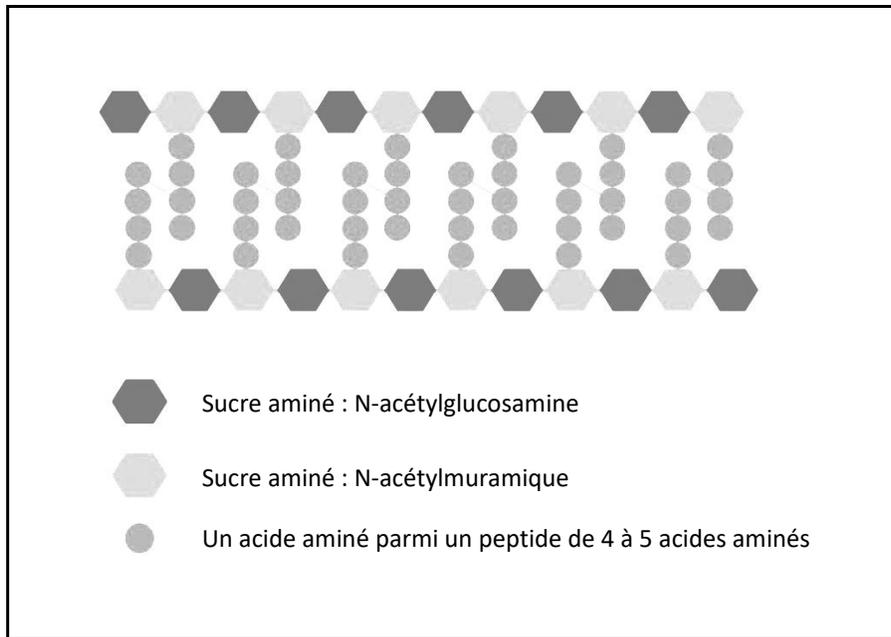


Figure 1.3: Structure du peptidoglycane composant la paroi des bactéries Gram -.

Précédant les années 1990, la théorie stipulait qu'en situation de compétition, les microorganismes prenaient en charge l'azote organique et inorganique au détriment des plantes et la minéralisation était considérée le processus clé (Schimel & Bennett, 2004). Depuis, les recherches ont pu conclure que les plantes ne sont pas à la merci des activités microbiennes afin de s'approvisionner en azote. Le phénomène régulant le cycle de l'azote s'avère plutôt la dépolymérisation effectuée par des enzymes extracellulaires majoritairement microbiennes (Figure 1.4). Les activités 1) dépolymérisantes (protéines en peptides ou macromolécules bactériennes et fongiques en monomères) ainsi que 2) protéolytiques (peptides en acides aminés) sont limitantes (Jan *et al.*, 2009). La conversion de protéines en acides aminés est environ 20x plus lente que la minéralisation d'acides aminés en NH_4^+ (Jan *et al.*, 2009). Quoique le processus soit plus lent, son taux demeure constant malgré des changements abiotiques tels que l'élévation de CO_2 , l'augmentation de température et la sécheresse, prouvant sa résilience. Par ailleurs, le renouvellement du *pool* d'acides aminés s'effectue beaucoup plus rapidement que celui de l'ammonium et du nitrate (Noll, Zhang & Wanek, 2019; Jones *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2019; Jones & Kielland, 2002).

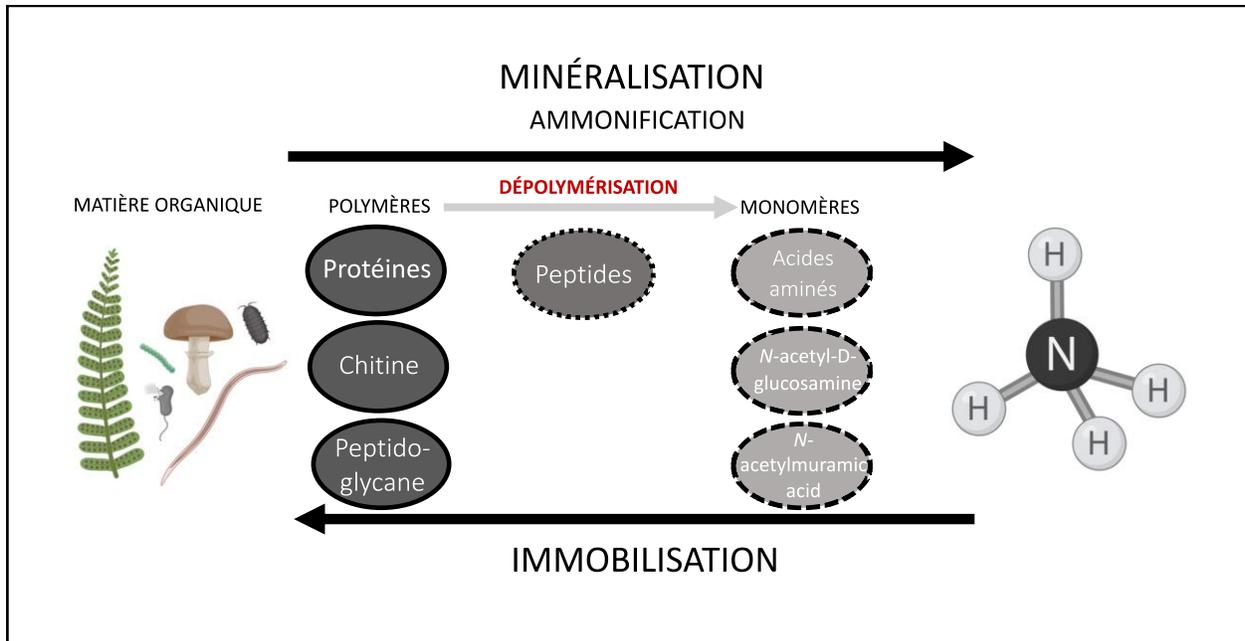


Figure 1.4: La minéralisation de la matière organique en azote inorganique.
 La prise en charge d'azote inorganique par les organismes (microscopiques et macroscopiques) est illustrée par la flèche nommée immobilisation.

L'assimilation d'azote organique par les plantes

Une autre conception, auparavant dominante, était que l'azote organique devait être « ammonifié » en NH_4^+ pour être accessible aux plantes (Figure 1.4). Il est désormais bien connu que les mycorhizes permettent aux plantes d'acquérir l'azote organique (Thirkell, Cameron & Hodge, 2016; Nuccio *et al.*, 2013). Les mycorhizes améliorent la compétitivité des plantes considérablement, puisque comme les autres microorganismes leur ratio surface-volume et leur croissance sont avantageux. Toutefois, les plantes peuvent aussi assimiler l'azote organique sans l'aide de microorganismes. En fait, des protéases libérées à la surface racinaire de plusieurs plantes agricoles peuvent dégrader les protéines afin d'incorporer les peptides via transporteurs membranaires au niveau des racines ou encore par endocytose (Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2008; Tegeder & Rentsch, 2010; Godlewski & Adamczyk, 2007). De plus, les plantes peuvent assimiler les acides aminés (Chapin, Moilanen & Kielland, 1993; Hill *et al.*, 2011). Les plantes dépensent moins d'énergie lors du convertissement des acides aminés en protéines alors leur contenu protéique est amélioré (Chapin, Moilanen & Kielland, 1993; Hill *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2014; Ghasemi *et al.*, 2013). Il a été démontré que les plantes peuvent même assimiler les acides aminés D constituant en partie les peptides retrouvés dans le peptidoglycane bactérien (Hill *et al.*, 2011). Les plantes telles que la tomate et le riz peuvent assimiler certains sucres aminés et cette

assimilation est favorisée lorsque le ratio C :N est faible (~10) (Li, 2014). Cependant, une autre étude atteste que les racines de jeunes plants de maïs (7 jours) ont été incapables d'assimiler la glucosamine et qu'à des concentrations élevées, ce sucre aminé a été toxique (Roberts & Jones, 2012).

La relation carbone-azote

Le ratio C :N doit être considéré lors de l'application de fertilisants organiques, puisque des engrais trop riches en carbone créent des conditions très limitantes en azote et favorisent l'immobilisation de cet élément par les microorganismes. Effectivement, des fertilisants ayant un ratio plus élevé que 15, c'est-à-dire 15g de C pour 1g de N, réduisent la biodisponibilité d'azote à court terme (~ 10 semaines). Dans une situation inverse où le ratio s'avère plus faible (7.6 et 6.6), la vitesse de minéralisation ainsi que les rendements de canola augmentent (Qian & Schoenau, 2002). Ce phénomène s'explique par le fait que les microorganismes ajustent leur efficacité d'assimilation d'azote selon le ratio C:N. Notamment, les microorganismes conservent l'azote organique (immobilisation) en contexte de carence en N et relâchent cette ressource sous forme d'ammonium (minéralisation) en contexte de carence en C (Mooshammer *et al.*, 2014; Noll, Zhang & Wanek, 2019). Des indicateurs possiblement plus représentatifs de l'intensité des activités microbiennes dans le sol sont la respiration et la quantité d'ATP, puisqu'ils sont corrélés à la minéralisation et l'immobilisation d'ammonium (Bengtsson, Bengtson & Månsson, 2003).

La volatilisation

Une dernière façon que l'azote peut s'échapper du sol est par volatilisation : un phénomène qui se produit généralement à la suite d'une application d'urée sur une surface cultivable. Des conditions climatiques sèches, chaudes et venteuses ainsi que certaines propriétés du sol (pH élevé et une faible capacité d'échanges cationiques) favorisent la transformation d'urée en ammoniac gazeux par une enzyme nommée uréase (Sun *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2018). La perte par volatilisation est estimée à 14% (10–19%) pour l'azote de provenance chimique et à 23% (19–29%) pour l'azote issu de fumier (Bouwman *et al.*, 2002). Les émissions de NH₃ sont passées de 1.9 ± 0.03 à 16.7 ± 0.5 Tg N an⁻¹ entre 1961 et 2010 (Xu *et al.*, 2019). L'ensemble des pertes d'azote (lessivage, volatilisation, dénitrification et ANAMMOX) représente un énorme fardeau environnemental et financier (Sobota *et al.*, 2015). Ces conséquences peuvent être remédiées en améliorant les interactions entre les plantes et les microorganismes du sol afin d'optimiser la rétention d'azote dans le sol et l'absorption plus efficace par les plantes.

Un survol des fertilisants azotés utilisés

L'ammoniac anhydre, l'urée, le sulfate d'ammonium, le nitrite de calcium d'ammonium et les solutions d'UAN (un liquide contenant de l'urée et du nitrate d'ammonium (NH_4NO_3)) représentent les types de fertilisants les plus utilisés en agriculture (Tableau 1.1) (Butzen, 2013; Sanderson, 2019). Le fumier est également une source d'azote importante qui permet de maintenir la structure du sol et de contrer l'érosion. En 2010, 48.4% des fermes canadiennes ont incorporé du fumier dans leurs champs (Dorff & Beaulieu, 2014). Des fertilisants moins populaires, mais très intéressants dans l'optique de développer une agriculture moins polluante sont les engrais à libération lente, l'ajout de matières organiques (engrais verts) et le compost (Chen *et al.*, 2018a; Roy, 2008).

Tableau 1.1 : Pourcentage d'azote composant les fertilisants chimiques courants (Hignett, 1985)

Fertilisants	Pourcentage d'azote
Ammoniac anhydre	82
Urée	45-46
Nitrate d'ammonium	33 à 34
Solutions d'UAN	28 à 32
Nitrite de calcium d'ammonium	20.5 à 28
Sulfate d'ammonium	21

Outre l'azote (N), la croissance des récoltes est limitée par deux autres macronutriments : le phosphore (P) et le potassium (K). Donc, les fertilisants vendus pour la pelouse ou le jardin indiquent pratiquement toujours le ratio N-P-K. Selon un article publié par la *National Academy of Natural Sciences (NAAS)* un ratio de 4 :2 :1 est généralement idéal (NAAS, 2009). Ce ratio varie en fonction du type de culture, la pluviométrie, l'intensité agricole, les propriétés du sol (nutriments, pH, chimie), la surface cultivée et l'irrigation (Kihara *et al.*, 2016; Macholdt, Piepho & Honermeier, 2019). L'application de fertilisants synthétiques N-P-K à long terme (40 – 50 ans), diminue la réserve d'azote dans le sol. Ce phénomène est causé par une augmentation du taux de minéralisation microbien engendrant une perte nette d'azote organique via la dénitrification, le lessivage et l'immobilisation par les plantes agricoles (Mulvaney, Khan & Ellsworth, 2009).

1.3 La cohabitation dynamique entre les plantes et les microorganismes du sol

1.3.1 Les tactiques microbiennes influençant les plantes

La production et la dégradation des phytohormones

Les plantes ne sont pas les seules à libérer des phytohormones dans l'environnement. La notion que les microorganismes du sol sont en mesure de produire une variété de phytohormones est bien attrayante dans une perspective de promouvoir la croissance et le rendement des récoltes. Bénéficier des effets de ces molécules signalétiques en agriculture s'avère néanmoins très délicat. Par exemple, un ensemble de phytohormones conférant une résistance au stress thermique peut réduire le rendement de la plante (Wu *et al.*, 2016). Néanmoins, ces microorganismes, incluant plusieurs genres bactériens et fongiques, pourraient être utilisés comme engrais biologiques en agriculture (Olanrewaju, Glick & Babalola, 2017; Shah *et al.*, 2018). Les phytohormones intéressantes, dont les effets sont résumés à la Figure 1.5, sont les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique (ABA), l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique. De manière générale, les cytokinines, les gibbérellines et les auxines stimulent la croissance des plantes. L'ABA confère une résistance à la sécheresse en diminuant l'ouverture des stomates et en engendrant la sénescence foliaire des plus vieilles feuilles au profit des nouvelles (Zhao *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2015). L'action de l'éthylène est surtout constatée lors de stress en plus du mûrissement des fruits (Dubois, Van den Broeck & Inzé, 2018; Druege, 2006). La production bactérienne de 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) désaminase permet de dégrader le précurseur immédiat de l'éthylène. La désaminase contribue alors à réduire les taux de cette phytohormone. Si la plante perçoit moins d'éthylène sa croissance est généralement favorisée, car le signal chimique indiquant un état de stress est minimisé (Gupta & Pandey, 2019; Onofre-Lemus *et al.*, 2009; Nascimento, Rossi & Glick, 2018). Les auxines (précisément l'acide indole-3-acétique : IAA) et l'acide salicylique peuvent également se faire dégrader par les bactéries du sol (Nascimento, Glick & Rossi, 2019). De plus, l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique défendent la plante contre les phytopathogènes (Kachroo & Kachroo, 2007; Mur *et al.*, 2013). Les phytohormones relâchées par les bactéries du sol procurent généralement une résistance aux carences en azote. Néanmoins, les auxines, l'éthéphon et la chlorure chlorocholine peuvent bloquer les activités protéolytiques du sol. L'inhibition des protéases de plantes et des microorganismes entraîne un ralentissement de la minéralisation, soit la décomposition des macromolécules jusqu'à l'ammonium (Holik & Vranová, 2019). De façon plus indirecte, certaines

bactéries peuvent produire des composés organiques volatils (COVs) qui influencent la production de phytohormones chez la plante (Zhang *et al.*, 2007).

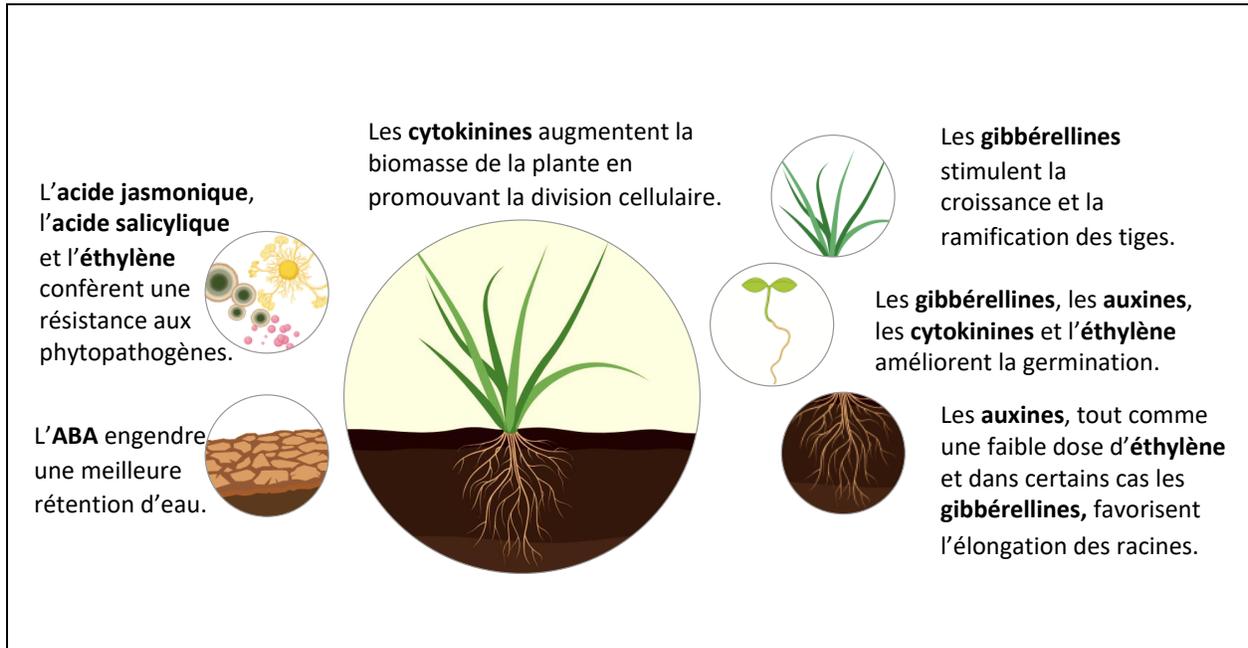


Figure 1.5 : Résumé des effets des phytohormones sur la croissance des plantes. (Arkhipova *et al.* 2005, Hare, Cress & van Staden 1997, Tanimoto 2005, Bottini, Cassán & Piccoli 2004, Wang *et al.* 2017, Kudoyarova, Arkhipova & Melent'ev 2015, Spaepen, Vanderleyden & Remans 2007, Martínez-de la Cruz *et al.* 2015, (Miransari & Smith, 2014) À noter, les plantes stimulées par les cytokinines n'ont pas pour autant des racines plus longues que les plantes contrôles (Arkhipova *et al.*, 2005).

Les symbiotes

Les symbioses sont les interactions plante-microbes les plus étudiées. Elles reflètent un langage interrègne sophistiqué. Parmi celles-ci se trouvent les symbioses avec les diazotrophes. Parmi les relations il y a plusieurs catégories : 1) les bactéries en symbioses avec les plantes vasculaires, 2) les cyanobactéries en mutualisme avec des plantes ou avec des mycètes et levures (lichens) et 3) des microorganismes autotrophes ou hétérotrophes associés aux particules du sol (Crews, 1999). Pour fixer l'azote ces microorganismes doivent se situer dans une niche pauvre en oxygène, car l'enzyme nitrogénase est inhibée par l'oxygène et les dérivés réactifs de l'oxygène (Masson-Boivin & Sachs, 2018). Toutefois, l'oxygène est essentiel afin de fournir l'énergie nécessaire à la fixation d'azote, ainsi les diazotrophes ont plusieurs stratégies par rapport à la régulation oxygénée (Rutten & Poole, 2019). Les bactéries appartenant au groupe rhizobia et le genre *Frankia* peuvent induire la nodulation des racines des plantes (Poole, Ramachandran & Terpolilli, 2018). Le groupe rhizobia comprend en fait tous les microorganismes infectant les racines des légumineuses (famille Fabaceae) formant des bactéroïdes fixant le diazote. Le genre *Frankia* est plutôt associé aux ordres Fagales, Rosales, Cucurbitales (Van

Nguyen & Pawlowski, 2017). La nodulation leur procure une niche écologique adaptée à leurs besoins métaboliques. La symbiose rhizobia-Fabaceae génère le taux de fixation le plus efficace : entre 52 et 300 kg d'azote sont fixés par hectare par année (Lindström & Mousavi, 2019).

Les mycorhizes sont un autre exemple de symbiose interrègne très répandue. Les mycorhizes sont présentes chez 80% des plantes et s'avèrent généralement bénéfiques pour les deux participants en raison des échanges nutritifs (Figure 1.6). Néanmoins, lorsque la densité de colonisation est trop élevée, la mycorhization peut être néfaste pour la performance de la plante (Garrido *et al.*, 2010; Johnson, Graham & Smith, 1997).

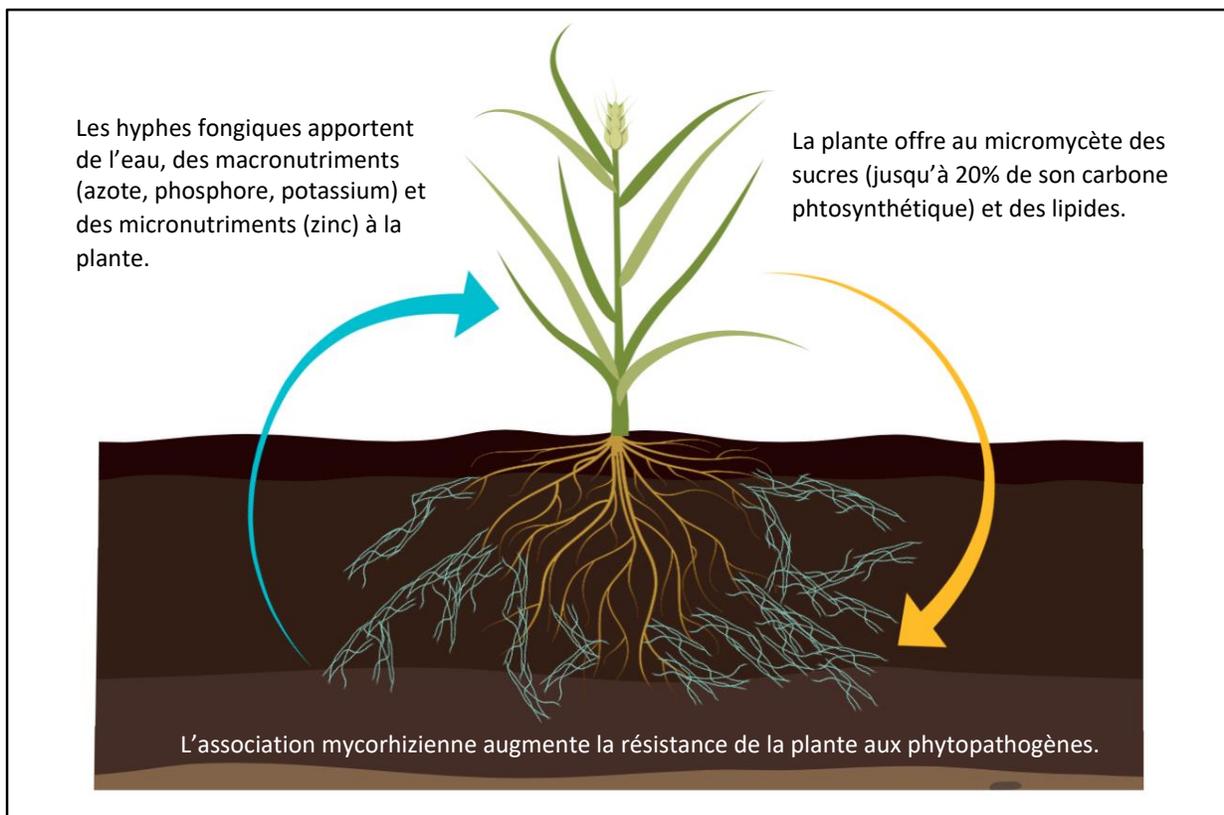


Figure 1.6 : Échanges entre une plante et les micromycètes endomycorhiziens arbusculaires. (Wang *et al.*, 2017; Bago, Pfeffer & Shachar-Hill, 2000)

Les mycorhizes arbusculaires, en plus de jouer un rôle principal quant au transfert de phosphore aux plantes, transmettent des ressources azotées. De façon indirecte, les mycorhizes arbusculaires stimulent aussi la fixation d'azote chez les légumineuses (Püschel *et al.*, 2017). Les ectomycorhizes et les

mycorhizes ericoïdes contribuent d'autre part à la dépolymérisation d'azote organique (Talbot *et al.*, 2013; Read & Perez-Moreno, 2003). Certaines mycorhizes protègent la plante contre une variété de phytopathogènes (Liang *et al.*, 2015; Elsen *et al.*, 2008; Olowe *et al.*, 2018). Les inocula de micromycètes mycorhiziens peuvent être achetés afin de favoriser leur symbiose avec les racines des plantes cultivées. Cependant, l'efficacité de ces marchandises demeurent controversées principalement en raison de l'absence de suivi écologique (Gupta & Abbott, 2021).

Les microorganismes favorisant la croissance des plantes (PGPM)

Certains microorganismes jouent des rôles dans l'amélioration de la croissance des plantes. Les modes d'action des microorganismes favorisant la croissance des plantes (PGPM) sont divers et peuvent permettre aux plantes d'acquérir plus facilement des nutriments, lutter contre les phytopathogènes et augmenter la résistance aux stress abiotiques (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Liste de quelques taxons favorisant la croissance des plantes.

Caractéristiques des PGPM	Taxons	Littérature
Propriétés de biocontrôles	Amibes	(Geisen <i>et al.</i> , 2015)
	Bactéries	(Chan <i>et al.</i> , 2020; Kumar <i>et al.</i> , 2010; Vurukonda, Giovanardi & Stefani, 2018; Masmoudi <i>et al.</i> , 2019)
	Bactériophages	(Fujiwara <i>et al.</i> , 2011; Buttimer <i>et al.</i> , 2017) (Mukherjee <i>et al.</i> , 2020)
	Levures	
Amélioration de l'acquisition de nutriments	Amibes	(Ripa <i>et al.</i> , 2019)
	Bactéries	(Vejan <i>et al.</i> , 2016; Jog, Nareshkumar & Rajkumar, 2012)
	Levures	(Fernandez-San Millan <i>et al.</i> , 2020)
	Micromycètes mycorhiziens	(Chen <i>et al.</i> , 2017)
Augmentation de la résistance au stress abiotiques (métaux, sécheresse, salinité, pH, etc.)	Bactéries	(Masmoudi <i>et al.</i> , 2019; Tak, Ahmad & Babalola, 2013; Kearl <i>et al.</i> , 2019)
	Micromycètes endophytes	(Bonkowski, 2004; Clarholm, 1985) (Miransari, 2017; Romero-Munar <i>et al.</i> , 2019; Li <i>et al.</i> , 2019b)
	Micromycètes mycorhiziens	

Outre les phytohormones telles que les gibbérellines, l'ABA et l'acide indole 3-acétique classée dans la famille des auxines, les PGPM produisent une variété de molécules bénéfiques à la croissance des plantes : 1) des enzymes lytiques pouvant dégrader les polymères organiques insolubles (Hakim *et al.*, 2021), 2) des molécules anti-phytopathogènes (certains composés organiques volatils (COVs) et

antibiotiques) (Sharifi & Ryu, 2018; Beneduzi, Ambrosini & Passaglia, 2012), 3) des sidérophores (Grobelač & Hiller, 2017), 4) de l'ammoniac (NH₃) via l'activité de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase (Viterbo *et al.*, 2010) et 5) des acides organiques solubilisant le phosphate inorganique (Pi) (Kalayu, 2019). Parmi les PGPM, se trouvent des bactéries favorisant la colonisation des racines par les micromycètes ectomycorhiziens (*mycorrhization helper bacteria*). Leur implication peut se constater à plusieurs niveaux : la réceptivité des racines au mycobionte, la reconnaissance racine-micromycète, la croissance du micromycète, la modification des propriétés rhizosphériques et la germination des micromycètes (Garbaye, 1994; Rigamonte, Pylro & Duarte, 2010).

Les protistes sont également des joueurs non-négligeables au sein des interactions plante-microbiote. Ce groupe inclut des microorganismes eucaryotes généralement unicellulaires qui ne sont ni des mycètes, ni des plantes et ni des animaux. Certains protistes sont indirectement des PGPM et leur présence peut favoriser la production de phytohormones rhizobactériennes (Bonkowski, 2002) ou le recyclage d'azote organique destiné aux mycorhizes (Bukovská *et al.*, 2018). Contrairement à la plante, les protistes contribuent à moduler le microbiote *top-down* plutôt que *bottom-up* (Gao *et al.*, 2019). Par la prédation sélective des bactéries et des mycètes au niveau de la rhizosphère, les protistes restructurent le microbiote. Cette restructuration est donc déclenchée par un niveau trophique élevé, soit les prédateurs (*top-down*). Tandis que la plante – un organisme photosynthétique considéré comme le premier niveau trophique – structure le microbiote en relâchant divers métabolites (sucres, acides organiques et acides aminés) disponibles à une variété de microorganismes. Cette modulation stimule les niveaux trophiques dégradeurs (*bottom-up*). La prédation menée par les protistes libère plusieurs nutriments assimilables par la plante. Par ailleurs, les protistes ont généralement un ratio C:N plus élevé que leurs proies favorisant ainsi la minéralisation de l'azote et augmentant son assimilation par la plante (Clarholm, 1985).

1.3.2 Les stratégies des plantes pour moduler le cortège microbien

Le *priming* rhizosphérique et les métabolites primaires

L'effet de *priming* rhizosphérique (EPR) se caractérise par un changement de la décomposition de la matière organique soluble (MOS) en raison des activités se déroulant au niveau des racines de la plante (Kuzyakov, 2002). L'EPR peut augmenter la décomposition de la MOS d'environ 60% et augmenter le taux brut de minéralisation d'azote moyen de 36 à 62% (Huo, Luo & Cheng, 2017; Zhu *et al.*, 2014). Un

facteur végétal déterminant l'EPR est l'intensité photosynthétique (Kuzyakov, 2002; Kuzyakov & Cheng, 2001). Une activité photosynthétique élevée génère plus d'exsudats promouvant davantage la décomposition de la matière organique et le relâchement d'azote (Bengtson, Barker & Grayston, 2012). Par contre, dans les systèmes limités en phosphore, l'EPR est écarté au profit de la mobilisation du P (Dijkstra *et al.*, 2013). De façon générale, l'EPR a lieu lorsque la plante est limitée en azote et les microorganismes sont limités en carbone (Bengtson, Barker & Grayston, 2012). L'exsudation de carbone (sucres, acides organiques, mucilage et cellules végétales) favorise usuellement la croissance microbienne et subséquemment les besoins d'azote supportant cette prolifération. Ainsi, les microorganismes libèrent des enzymes protéolytiques ce qui augmente le *pool* d'azote biodisponible pour la plante (Moreau *et al.*, 2019). Une possibilité à noter est que la grande allocation de carbone de la plante vers les micromycètes mycorhiziens (jusqu'à 20% de C) limite le recrutement des autres microorganismes attirés par le carbone photosynthétique. Cette réduction de diversité parmi le *pool* microbien peut à certaines instances, rendre la plante plus susceptible aux pathogènes (Windisch *et al.*, 2020).

Outre l'exsudation, la plante peut modifier les propriétés physico-chimiques (structure et pH) du sol en relâchant des acides organiques (Khorassani *et al.*, 2011). Ces changements peuvent augmenter ou réduire l'EPR. De plus, le relâchement d'acides organiques joue un rôle dans la mobilisation du phosphore (Krishnapriya & Pande, 2016). Les acides aminés sont d'autres métabolites primaires exsudés par la coiffe (extrémité) racinaire. Une hypothèse actuelle est que l'exsudation d'acides aminés indique le statut azoté de la rhizosphère et permet à la plante de réguler l'assimilation des autres ressources azotées (Canarini *et al.*, 2019; Nazon *et al.*, 2003). La littérature stipule que certains acides aminés peuvent influencer l'architecture racinaire et confèrent à la plante une façon d'exploiter certaines niches riches en azote (Walch-Liu *et al.*, 2006; Forde, 2014). Une autre hypothèse courante est que l'exsudation d'acides aminés est une fuite accidentelle expliquée par la concentration élevée d'acides aminés au niveau des racines (Moreau *et al.*, 2019).

Les phytohormones et les autres métabolites secondaires

Les phytohormones sont des molécules signalétiques bioactives contribuant au système de défense végétal. Ces molécules peuvent aussi refléter les conditions azotées vécues par la plante. L'ABA, les auxines et les cytokinines influencent le transport d'azote (Kiba *et al.*, 2011). Par ailleurs, les auxines, les cytokinines et l'éthylène sont impliqués dans les interactions entre les microorganismes et les racines.

Effectivement, leur quantité est déterminante pour la nodulation (*Frankia* et rhizobia), la formation mycorhiziennes (ectomycorhizes et endomycorhizes) et l'infection pathogène (oomycètes et formation d'excroissance racinaires nommées galles ou cécidies) (Boivin, Fonouni-Farde & Frugier, 2016). Par ailleurs, la libération de strigolactones par la plante peut induire la germination des spores du micromycète mycorhizien. En revanche, le micromycète sécrète des facteurs Myc reconnus par la plante déclenchant ainsi le processus symbiotique intercellulaire. Une relation très forte existe entre la composition microbienne et la production de phytohormones ce qui démontre la fonction essentielle de ces molécules parmi les interactions plante-microbiote (Lu *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2015).

Les composés organiques volatils (COVs) sont un autre groupe de métabolites secondaires intéressants. Ces molécules peuvent facilement diffuser dans le sol et peuvent de cette façon exercer une influence écologique à plus large échelle et permettent élargissement de la zone sous l'influence de la plante (De la Porte 2020). Parmi les COVs se trouvent des molécules antimicrobiennes, signalétiques, des sources nutritives et des chimio-attractifs (Schulz-Bohm *et al.*, 2018; Liu & Brettell, 2019). Ainsi, ces métabolites modulent le microbiote racinaire et rhizosphérique (Chen *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019a; Berendsen *et al.*, 2018).

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires importants dans le processus de nodulation (Djordjevic *et al.*, 1987). Par exemple, certains flavonoïdes peuvent induire des effets de chimiotaxie attirant différents rhizobia (Aguilar *et al.*, 1988; Hartwig *et al.*, 1990). Généralement, les flavonoïdes impliqués dans la nodulation, sont produits lorsque les concentrations d'azote du sol sont faibles. Une fois à proximité, rhizobia relâche des facteurs Nod. La plante possède des récepteurs pour ces facteurs ce qui engendre une cascade bio-physio-chimique engendrant la symbiose nodulaire (Roy *et al.*, 2020). Certaines études stipulent également l'implication des flavonoïdes dans la formation de mycorhizes arbusculaires et dans la symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote du genre *Frankia* (Abdel-Lateif, Bogusz & Hocher, 2012).

La diversité des métabolites secondaires relâchés par la plante pouvant moduler le microbiote sont nombreux. Par exemple, en relâchant des benzoxazinoïdes, la plante peut modifier la communauté microbienne rhizosphérique et augmenter la résistance au broutage de la prochaine génération végétale (Hu *et al.*, 2018) La production d'alcaloïdes indoliques comme les camalexines influence également la composition microbienne du sol (Koprivova *et al.*, 2019). La plante peut aussi libérer des molécules

nommées coumarines qui permettent de moduler favorablement le microbiote, obtenir du fer et contrer des phytopathogènes (Stringlis *et al.*, 2018; Stringlis, de Jonge & Pieterse, 2019; Tsai & Schmidt, 2017). D'autres métabolites qui agissent de manière antagoniste aux phytopathogènes sont les peptides éliciteurs (Lee *et al.*, 2018; Hu, Zhang & Shi, 2018).

Il faut mentionner que malgré les avantages de l'exsudation racinaire, certains phytopathogènes ont co-évolués et perçoivent des métabolites spécifiquement relâchés par leur plante hôte. Les métabolites des plantes peuvent favoriser la germination des spores, la croissance, le déplacement vers les racines et l'infection par les microorganismes pathogènes (Scheffknecht *et al.*, 2006; Turrà *et al.*, 2015)

Le mucilage racinaire

La production de mucilage au niveau des racines aériennes de *Zea mays ssp. mexicana*, une variété de maïs mexicain, est un phénomène particulier favorisant la fixation de diazote atmosphérique. En fait, le mucilage, qui est riche en polysaccharides, confère une niche pauvre en oxygène (<5%) idéale pour l'activité de la nitrogénase des bactéries diazotrophes (Van Deynze *et al.*, 2018; Amicucci *et al.*, 2019). Le mucilage collant peut également faciliter l'ancrage des plantes grimpantes, favoriser l'invasion des plantes parasites sur une plante hôte, protéger les racines, faciliter la propagation des racines dans le sol et avantager la formation du *rhizosheath* : une couche de particules du sol à la surface racinaire protégeant du stress hydrique (Basirat *et al.*, 2019; Galloway, Knox & Krause, 2020). Des protéines et de l'ADN retrouvés dans le mucilage ont des propriétés antimicrobiennes (Wen *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010).

1.4 Un secret bien gardé : le relâchement des micro-ARNs par les plantes

Le paradigme englobant les interactions entre la plante et le microbiote est incomplet. Les micro-ARNs (miARNs) des plantes sont un groupe à considérer au sein du paradigme actuel. Ces molécules sont des ARNs non codants de 20 à 24 nucléotides jouant un rôle essentiel dans la régulation post-transcriptionnelle de la plante (Yu, Jia & Chen, 2017b; Zhao, Cong & Lukiw, 2017).

Biogenèse

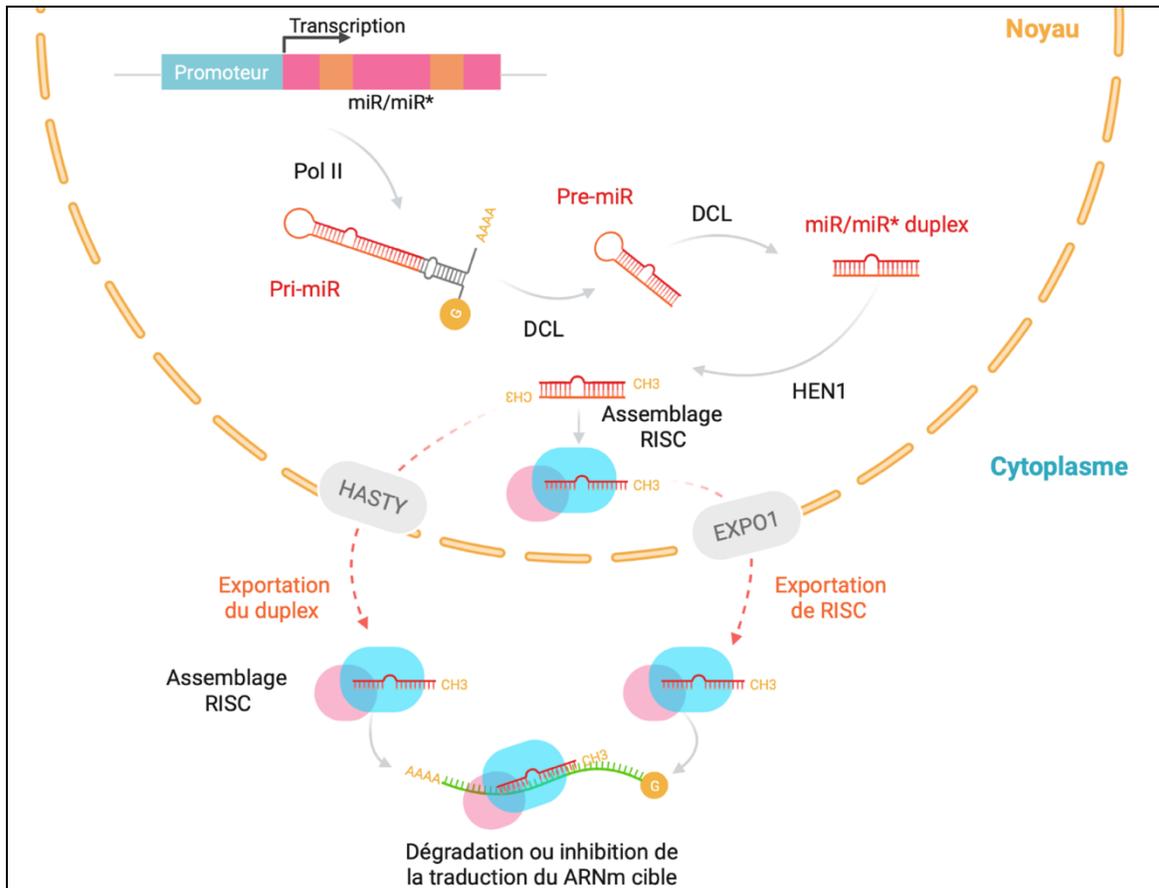


Figure 1.7 : Biogenèse des miARNs végétaux.

Les miARNs sont regroupés en familles. Les miARNs matures d'une famille sont généralement transcrits ensemble et peuvent avoir des séquences très similaires ou une région (bases des positions 2 à 8) conservée (Schwab *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Il existe des miARNs introniques et des miARNs intergéniques. Les miARNs intergéniques ont des unités de transcription indépendantes. C'est-à-dire que ces miARNs proviennent d'une région du génome possédant son propre promoteur et produisant un transcript qui n'est pas associé à des transcrits provenant de gènes voisins. Les miARNs introniques, plus rares dans le règne végétal, sont transcrits avec l'ARNm qu'ils ciblent, c'est-à-dire la transcription du miARN et du ARNm cible est coordonnée (Millar & Waterhouse, 2005). Les transcrits tige-boucle obtenus grâce à l'action de l'ARN Polymérase II (Pol II) ont une coiffe m⁷G 5' et une terminaison polyadénylée. Ces transcrits se nomment miARN primaire (Pri-miR) et varient grandement en longueur (60-500 nt). Une fois que les bras du Pri-miR sont clivés par le complexe dicing qui est composé d'une endonucléase *DICER-LIKE* (DCL) *HYPONASTIC LEAVES1* (HYL1) et *SERRATE* (SE), le fragment tige-boucle se

nomme miARN précurseur (Pre-miR). Parmi les quatre endonucléases DCL de la famille RNase III, chez *Arabidopsis*, DCL1 est l'enzyme la plus impliquée dans la biogenèse de miARNs (Fang & Spector, 2007). Autrement, chez *Arabidopsis* la DCL4 contribue également au prétraitement des miARNs (Rajagopalan *et al.*, 2006). Ensuite, un second complexe dicing avec DCL clive la boucle du Pre-miR libérant ainsi le duplex miR/miR*. Le duplex est méthylé par la protéine méthyltransférase *HUA ENHANCER1* (HEN1) à la position 2'-O du dernier ribose (3') de chaque brin. Cette méthylation est caractéristique de la biogenèse des miARNs végétaux et confère possiblement à ceux-ci une protection contre les exonucléases ciblant la terminaison 3' et facilite la reconnaissance des miARNs par les protéines *ARGONAUTE* (AGO) du complexe protéique *RNA induced silencing complex* (RISC) (Yu *et al.*, 2005; Zhao, Mo & Chen, 2012). Le lieu d'assemblage de RISC peut être dans le noyau ou dans le cytoplasme. Par contre, il a récemment été démontré que l'assemblage de ce complexe protéique se fait principalement dans le noyau (Bologna *et al.*, 2018). Lors de l'assemblage, le brin guide du duplex miR/miR* est conservé dans RISC alors que le brin passager est souvent dégradé. Précisément, le brin guide doit être pris en charge par AGO afin que le complexe RISC soit fonctionnel. Pour l'assemblage RISC cytoplasmique, le duplex miR/miR* est exporté via la protéine *HASTY* (Park *et al.*, 2005) (voir Figure 1.7 pour un résumé de la biogenèse des miARNs des plantes).

Modes de régulation

Les miARNs guident RISC vers la cible. La complémentarité implique majoritairement la partie 5' du miARN (Parizotto *et al.*, 2004) et entraîne le clivage de la cible ou l'inhibition de sa traduction. En cas de clivage, le domaine PIWI de la protéine AGO effectue l'activité endonucléotique de l'ARNm cible (Yu, Jia & Chen, 2017a). L'inhibition de la traduction est un mode d'action indépendant et implique l'intervention de facteurs précis qui ne sont pas nécessaires pour le clivage. L'inhibition de la traduction ne nécessite pas la déadénylation de l'ARNm cible. Le miARN peut plutôt inhiber l'initiation de la traduction (lorsque la cible est dans la région 3'UTR) ou empêcher le mouvement des ribosomes (Iwakawa & Tomari, 2013).

En plus de cliver ou inhiber la traduction, certains miARNs végétaux déclenchent la production de phased secondary siRNAs (phasi-ARNs). Parmi les phasiARNs, les *Trans-acting siRNA* (tasiARN) sont les mieux étudiés. Les modes d'action des miARNs contribuant à la biogenèse des phasiARNs sont le *one hit pathway*, où il y a une seule cible pour un miARN de 22 nt, et le *two-hit pathway* où il y a deux cibles pour des miARNs de 21 nt (Fei, Xia & Meyers, 2013). Les phasiARNs contribuent hypothétiquement à

l'amélioration des interactions plante-microbiote en procurant une défense à la plante ou en conférant à celle-ci des avantages évolutifs. Plus récemment, une étude explorant le génome entier d'*A. thaliana* a démontré qu'il y a une coordination entre les miARNs et les phasiARNs entraînant la co-régulation de l'expression génétique (Vargas-Asencio & Perry, 2019).

Les cibles des miARNs végétaux sont généralement plus faciles à identifier que celles des animaux. En fait, la régulation post-transcriptionnelle des miARNs animaux dépend surtout de la région-noyau située entre la deuxième et huitième base alors que les miARNs végétaux nécessitent beaucoup plus de complémentarité avec leur cible. La conservation de noyaux rend les miARNs animaux plus généralistes, alors que les miARNs végétaux sont plus spécialistes et mènent plus souvent au clivage des cibles (Axtell & Meyers, 2018).

Interactions interrègnes

Les miARNs peuvent également influencer l'expression génétique de d'autres organismes associés à l'hôte ou hors de l'hôte. Les modes de transport protégeant les miARNs sont 1) des vésicules extracellulaires (EVs) tels que les exosomes entre 30 et 100 nm provenant d'un bourgeonnement de la membrane plasmique (Baldrich *et al.*, 2019; Mu *et al.*, 2014), 2) des EVs provenant de *multivesicular bodies* (MVBs) (200 à 500nm) qui sont des endosomes spécialisés et relâchent des vésicules intraluminales (ILVs) (35nm) dans l'espace apoplastique lors de leur fusion (Li *et al.*, 2018; Rutter & Innes, 2018), 3) des *plant-derived exosomes-like nanoparticles* (ELNs) et une acquisition lipide-dépendante (Teng *et al.*, 2018b) et 4) des microvésicules (20nm à 1µm) (Li, Xu & Li, 2018). La sécrétion d'EVs par les cellules végétales demeurent énigmatique étant donné la rigidité de leur enveloppe cellulaire. En fait, pour que les EVs traversent la paroi végétale, celle-ci doit être modifiée (agrandissement des pores, amincissement ou perte d'intégrité) autrement, une pression mécanique serait nécessaire pour expulser les EVs (Rutter & Innes, 2018). La livraison des EVs précédents est d'autant plus mystérieuse, mais les mécanismes supposés sont l'acquisition lipide-dépendante, la fusion membranaire et l'endocytose.

Récemment, il a été démontré que des petits ARNs d'*Arabidopsis thaliana* sont préférentiellement enveloppés dans des vésicules extracellulaires (Baldrich *et al.*, 2019; Rutter & Innes, 2018). Ces vésicules extracellulaires permettent fort probablement la régulation post-transcriptionnelle à longue distance (de la tige aux racines) et l'interaction interrègnes (cross-kingdom) (Subramanian, 2019). Plusieurs

études démontrent que les miARNs des plantes agissent en tant que défense immunologique pour contrer des phytopathogènes. Par exemple, certains miARNs permettent une défense contre les infections virales tels que le miR1885 produit par *Brassica rapa* qui régule négativement la résistance virale (Cui *et al.*, 2020), le miR528 (lorsque moins exprimé, confère à la plante une meilleure résistance à l'infection virale) et le miR444 du riz (promeut la résistance immunitaire contre le virus) (Wang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2019). D'autres miARNs permettent de contrer des infections fongiques comme le miR164a impliqué dans l'immunité du riz contre le pathogène *Magnaporthe oryzae* (Wang *et al.*, 2018) et le miR477, le miR166 et le miR159 du coton qui interagissent directement contre le phytopathogène (Zhang *et al.*, 2016a; Hu *et al.*, 2020). Autrement, le miR393 d'*Arabidopsis* est impliqué dans l'inhibition indirecte de la croissance de *Pseudomonas syringae* (Navarro *et al.*, 2006).

Lors d'une infection par une pourriture blanche (oïdium), les cellules d'orge (*Hordeum vulgare*) ont accumulées des EVs et MVBs à proximité des plasmodesmes afin de bloquer la communication entre les cellules hypersensibles et les cellules saines (An *et al.*, 2006; An, van Bel & Hüchelhoven, 2007) (Voir Figure 1.8). Sachant désormais que les EVs peuvent contenir des petits ARNs antimicrobiens en plus d'être enrichies en protéines de défense (Rutter & Innes, 2018), dans le cas de phytopathogènes parasites, les EVs jouent un rôle double comme barrière physique et libératrices de molécules antimicrobiennes.

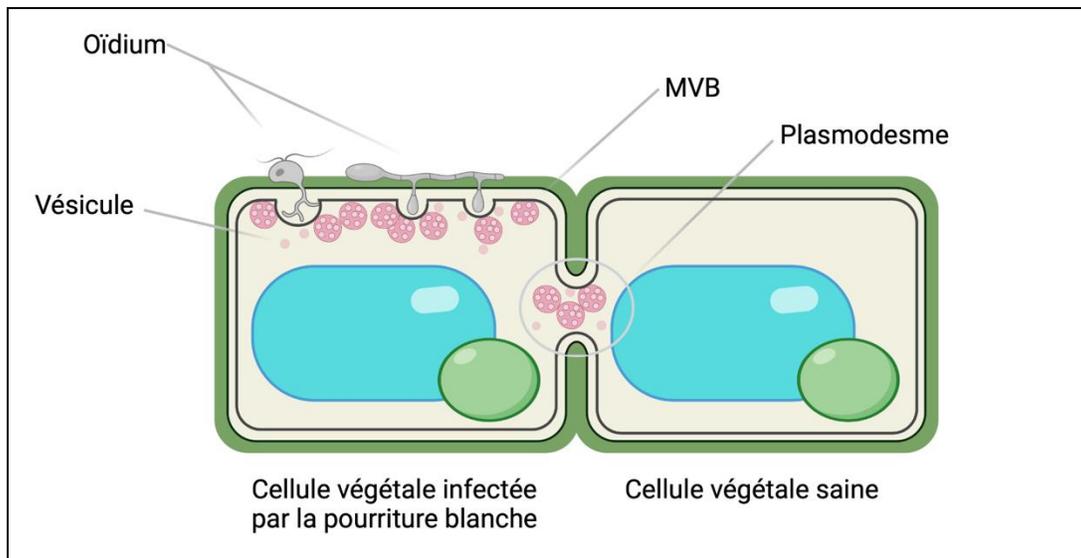


Figure 1.8 : Étude de cas de l'utilité des MVBs et EVs dans la résistance contre un oomycète.
N.B. la pénétration des haustoriums (organe qui pénètre la paroi végétale) des oïdiums a lieu entre la paroi végétale et la membrane plasmique.

Les miARNs influencent aussi l'expression des gènes des communautés microbiennes associées à un hôte multicellulaire, il a été suggéré que cela se produise aussi au niveau de la rhizosphère (Middleton *et al.*, 2021). En effet, des études montrent que les miARNs humains et des plantes ingérées influencent le microbiote intestinal (Liu *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2014; Teng *et al.*, 2018a). Concrètement, les ELNs de l'étude ont eu un contenu riche en lipides, en protéines et en miARNs (Mu *et al.*, 2014). Cette étude a stipulé que les ELNs végétaux obtenus par voie orale ont été assimilés par les macrophages intestinaux et les cellules souches. Or, aucune étude n'explore la possibilité que la sécrétion de miARNs se produit pour interagir avec le microbiote rhizosphérique.

2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Nos résultats préliminaires démontrent qu'*Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) et *Brachypodium distachyon* (*B. distachyon*) relâchent des miARNs au niveau de la rhizosphère qui se distinguent de ceux retrouvés au sein des racines ou dans le sol éloigné. Par ailleurs, les analyses bioinformatiques suggèrent que les ARNm bactériens ciblés par les miARNs de la rhizosphère ont un rôle important dans l'acquisition des ressources azotées tels que les acides aminés. Le sol est caractérisé par une concentration faible d'acides aminés renouvelée plus de 1000x par jour. Ce recyclage s'avère plus rapide que les taux de production de NH_4^+ et NO_3^- (Moreau *et al.*, 2019). Il est connu que le régime d'azote altère le miRNAbolome végétal en condition d'insuffisance en azote (Fischer *et al.*, 2013) chez le blé (Zuluaga *et al.*, 2017), le riz (Cai *et al.*, 2012) et le maïs (Zhao *et al.*, 2012). Par contre, l'identification des miARNs au sein de ces études est restreinte aux tissus végétaux. Mon hypothèse est que l'abondance relative des miARNs rhizosphériques ciblant les gènes bactériens responsables de l'absorption d'acides aminés, sera plus prononcée en présence d'acides aminés (Figure 2.1).

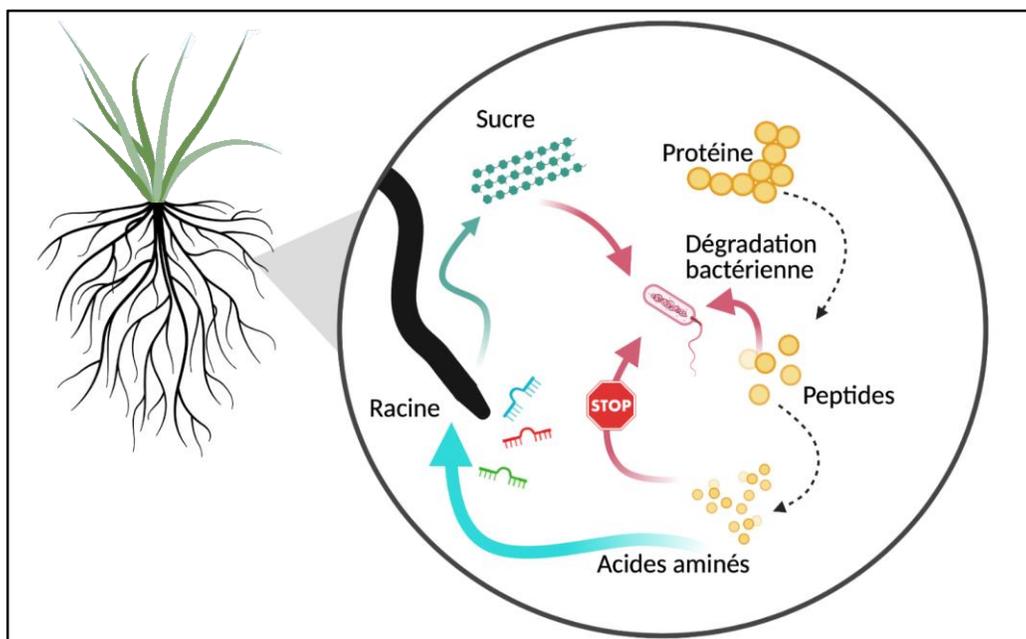


Figure 2.1 : Schématisation des interactions plante-microbiote via les miARNs. Suite au *priming* rhizosphérique la plante empêche les microorganismes d'acquérir les acides aminés en produisant des miARNs inhibant leurs transporteurs et perméases spécifiques.

Le but du projet est de démontrer, pour la première fois, que les plantes peuvent possiblement interférer avec l'utilisation d'azote des microorganismes du sol en relâchant des miARNs. En démystifiant ce processus, il sera possible d'utiliser ce mécanisme pour optimiser l'assimilation d'azote des plantes agricoles (Fischer *et al.*, 2013). Afin de réaliser cet objectif, deux plantes modèles ont été cultivées (*A. thaliana*, *B. distachyon*) en plus de témoins non-plantés sous l'influence de trois traitements de fertilisation azotée (NH_4NO_3 , acides aminés et aucun ajout d'azote). En utilisant ces plantes modèles, nous allons pouvoir attester l'étendue phylogénétique de ce phénomène et élucider les profils de sécrétion des miARNs impliqués dans la compétition pour l'azote.

Hypothèse et Objectif 1) Puisque la rhizosphère (la région du sol en contact avec les racines) est l'interface d'interaction la plus active et diversifiée (Berendsen, Pieterse & Bakker, 2012), je m'attends à trouver des miARNs dans ce compartiment. De plus, je stipule que l'interaction interrègne obtenue par le relâchement de miARNs chez les plantes est un phénomène répandu, ainsi certains miARNs devraient être communes à la rhizosphère des deux plantes modèles. L'objectif est de caractériser le profil des miARNs selon l'espèce végétale (*A. thaliana*, *B. distachyon* et des témoins non-plantés), le compartiment échantillonné (racines, rhizosphère, sol éloigné) et les trois traitements fertilisants.

Hypothèse et Objectif 2) Les miARNs représentent possiblement des outils relâchés par les plantes pour accroître leur compétitivité vis-à-vis les microbes afin de maximiser leur assimilation d'azote. Les miARNs rhizosphériques des plantes devraient donc être différents selon la biodisponibilité d'azote. L'objectif est l'identification des miARNs répondant significativement aux fertilisants ainsi que leurs cibles potentielles.

Hypothèse et Objectif 3) Mes attentes sont que le type de plantes, le compartiment échantillonné et les régimes fertilisants vont fortement influencer le microbiote du sol. L'objectif est la caractérisation des effets des différentes sources d'azote sur la structure microbienne (via les transcrits des gènes marqueurs ARNr 16S et la région ITS2) et d'éventuellement distinguer ces effets de l'influence des miARNs.

Hypothèse et Objectif 4) Les miARNs peuvent par complémentarité inhiber la traduction des ARNm microbiens cibles (Huang *et al.*, 2019b; Zhao & Guo, 2019). L'inhibition de certaines fonctions écologiques liées au cycle de l'azote devrait engendrer une modification du réseau microbien. Ainsi, je

pense que l'abondance de certains microorganismes devraient être corrélés négativement aux miARNs répondant significativement aux fertilisants. L'objectif est de repérer les corrélations statistiquement significatives.

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Dispositif expérimental

Un dispositif expérimental en blocs aléatoires a été conçu où chaque bloc a été composé de 9 pots (Figure 3.1). En tout, 10 blocs ont été placés en chambre de croissance. La position des blocs ainsi que la position des combinaisons fertilisation-type de semis caractérisant un bloc ont été déterminées au sort. Après une stratification thermique de 24 heures à 4°C à la noirceur, des semences d'*A. thaliana* Col0 (membre de la famille Brassicaceae) et de *B. distachyon* Bd 21-3 (membre de la famille Poaceae) ont été semées dans 20mL de sol (2/3 Quali Grow Black Earth, 1/4 sable et 1/12 sol du champ expérimental à l'INRS : 45°32'29"N 73°43'02"W). Trois pots par bloc n'ont pas été semés (témoins non-plantés). La programmation de la chambre de croissance a été: 12 heures de lumière du jour, 3 heures de lumière de crépuscule, 3 heures de lumière d'aube et 6 heures de noirceur à une humidité constante de 70%. Lorsqu'il y avait la lumière du jour la température maximale s'est élevée à 25°C, alors que durant la période de noirceur, la température s'est abaissée à 20°C. Au quatrième jour post-semaison les traitements fertilisants ont débuté et ont été appliqués à tous les 2-3 jours suivants. Ces traitements ont consisté d'une solution nutritive complète sans ajout d'azote seule, ou d'une solution nutritive supplémentée d'une solution équimolaire de 17 L-acides aminés ou d'une solution nutritive supplémentée de nitrate d'ammonium (NH₄NO₃). La quantité d'azote évaluée dans un litre de Quali Grow Black Earth est approximativement 2g, donc la quantité de départ d'azote dans un pot a été environ 0.4g. Les traitements supplémentés en azote ont contenu 0.190g d'azote/L. La quantité d'azote annuelle appliquée en 1961 était 0.900g d'azote/L et cette quantité a grimpé à 7.400g d'azote/L en 2013 (Lu & Tian, 2017). Alors, les amendements d'azote n'ont probablement pas été en excédent. Une variation phénotypique a pu être constatée entre les différents régimes (Annexe Figure S1.1) indiquant un effet plausible des fertilisants. Le ratio N:P:K a été approximativement 2 :2 :1, à l'exception du traitement sans azote. Une seule plante non-semée a poussé parmi les 90 pots et sa taille et son réseau racinaire ont été faiblement développés en comparaison à *A. thaliana* et *B. distachyon*. Aucune plante n'a poussé dans les témoins non-plantés. Au 21e jour post-semaison, les racines, la rhizosphère et le sol éloigné ont été échantillonnés L'échantillonnage des trois compartiments s'est déroulé comme suit : 1) le pot a été vidé de son contenu dans une nacelle préalablement nettoyée avec de l'éthanol 70% (Figure 3.3A), 2) la plante et son réseau racinaire ont été secoués et tapotés dans la nacelle afin de faire tomber

le sol non-attaché aux racines. Ce sol a été considéré comme du sol éloigné et a été placé dans un tube stérile de 15 mL. 3) afin de séparer le sol attaché à la surface racinaire (Figure 3.3B), considéré comme la rhizosphère, les racines ont été trempées dans un tampon phosphate salin stérile. Le sol dilué dans le tampon a été placé dans un ou deux tubes de 1.5 mL stérile. Cette méthode a été celle maximisant la récolte de la rhizosphère en endommageant le moins possible les racines. 4) par la suite, les racines ont été rapidement épongées avec du papier absorbant et placées dans un tube de 1.5 mL stérile. Immédiatement après que les échantillons ont été placés dans un tube, ceux-ci ont été surgelés dans de l'azote liquide (*flash-frozen*) avant d'être conservés à -80°C.

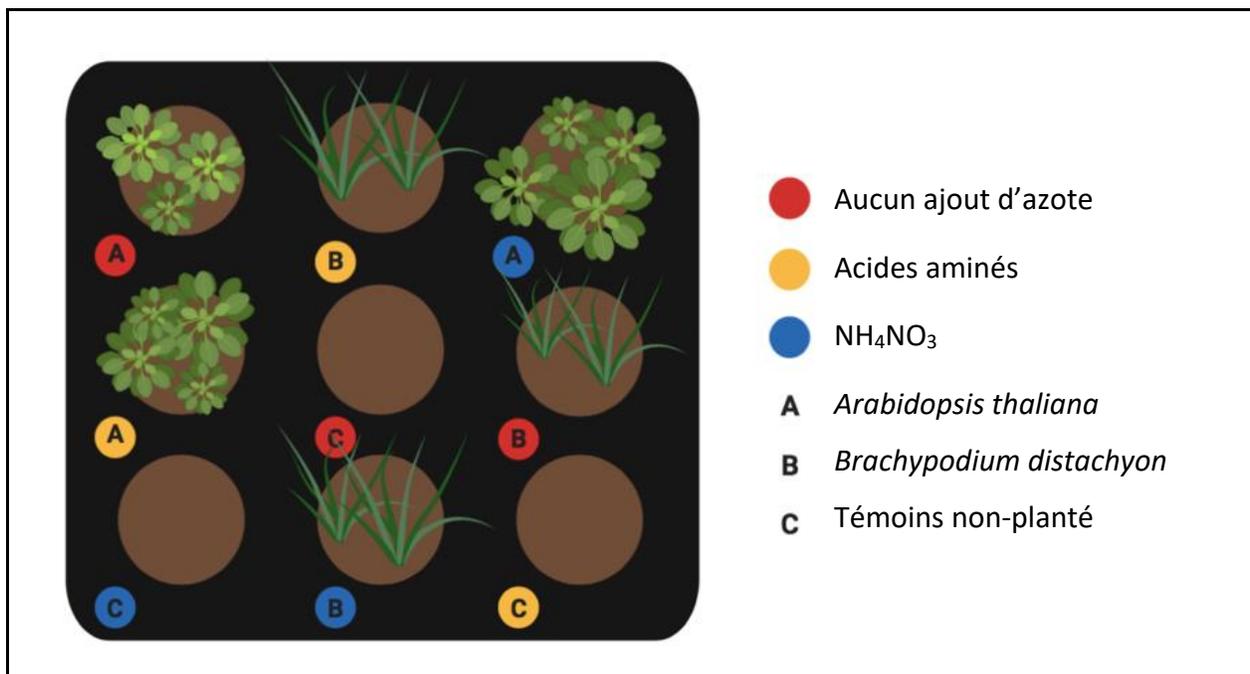


Figure 3.1 : Schématisation d'un bloc de l'expérience où les 9 combinaisons de fertilisation-type de semis se trouvent. La position des combinaisons au sein du bloc a été tirée au sort. La position de chaque bloc au sein de l'enceinte de croissance a également été déterminée aléatoirement.

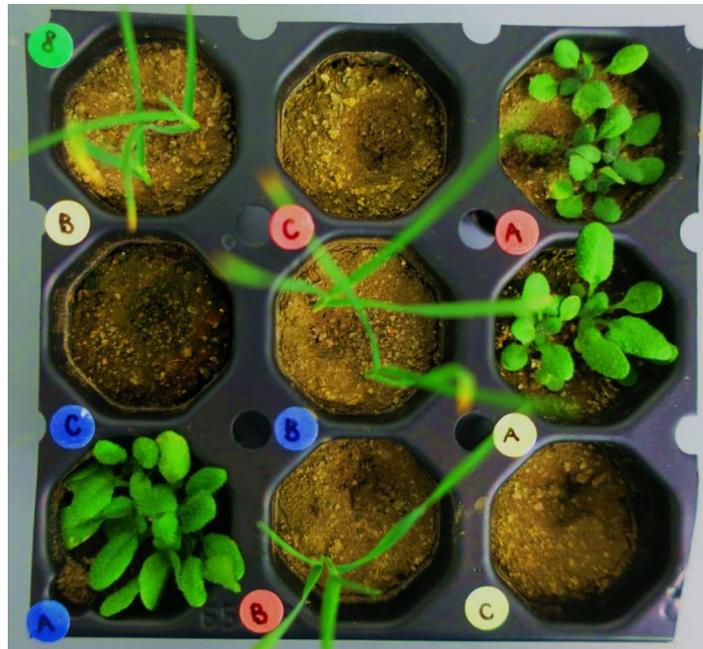


Figure 3.2 : Un des blocs échantillonnés lors de l'expérience. Se référer à la légende de la figure précédente.

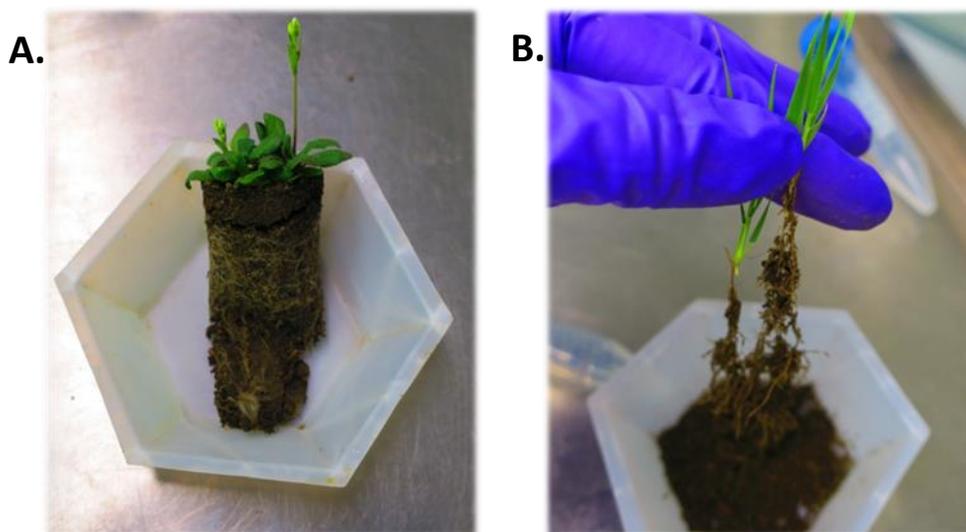


Figure 3.3 : Échantillonnage des compartiments. A. Le contenu d'un pot d'*A. thaliana* vidé dans une nacelle stérile. Le fin réseau racinaire peut être constaté. B. Deux plants de *B. distachyon* après avoir été secoués et tapotés dans la nacelle. Le sol dans la nacelle s'agit de sol éloigné alors que le sol encore attaché aux racines est la rhizosphère.

3.2 L'extraction d'ARN et le séquençage

L'ARN de la rhizosphère et du sol éloigné a été extrait avec la trousse RNeasy PowerSoil Total RNA de Qiagen en suivant les directives du fabricant. Les racines ont été lyophilisées pendant 3 heures avant d'être broyées mécaniquement à l'aide d'un micro-pilon afin d'extraire plus efficacement l'ARN avec la trousse RNeasy Plant Mini de Qiagen (en suivant les directives du fabricant). L'ARN de l'ensemble des échantillons a été traité avec un DNase (*Turbo DNA-free kit*, Ambion), nettoyé, concentré (RNA Clean & Concentrator 25µl, ZymoResearch) et conservé à -80°C en suivant les directives du fabricant. Seuls les échantillons avec une qualité acceptable (profil de spectrophotométrie non dégradé) ont été retenus. La qualité a été vérifiée par spectrophotométrie (NanoDrop), par électrophorèse sur gel d'agarose 4% (migration à 80V pendant 60-80 minutes) et par électrophorèse capillaire sur puce pour l'ARN destiné au séquençage des petits ARNs (*Agilent Bioanalyzer System*).

L'ARN a ensuite été envoyé pour le séquençage d'amplicons (Illumina MiSeq, CNRC-Royalmount, Montréal, Canada) et le séquençage de miARNs (Illumina HiSeq4000, Centre d'expertise et de services de Génome Québec, Montréal, Canada). Le fait de séquencer l'ARN plutôt que l'ADN pour les amplicons permet une meilleure identification de la communauté microbienne active. Les amplicons séquencés ont été les transcrits du gène ARNr 16S des bactéries et des archées (régions V4 et V5) et la région transcrite du *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2). Les RT-PCRs ont été effectuées avec la trousse 210212 *OneStep RT-PCR kit* dans un volume final de 25 µL en suivant les directives du fabricant. Le séquençage des amplicons a été effectué avec le système Illumina MiSeq en utilisant la trousse *MS-102-2003 MiSeq Reagent Kit v2 500-cycle* en suivant les directives du fabricant. Les amorces utilisées pour les amplicons des transcrits du gène ARNr 16S ont été : 515F-Y (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) et 926R (CCGYCAATTYMTTTRAGTTT). Les amorces utilisées pour les amplicons des transcrits de la région ITS2 ont été ITS9F (GAACGCAGCRAAIIGYGA) et ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

RT-PCR pour amplifier les transcrits du gène ARNr 16s

Les volumes utilisés pour la RT-PCR des transcrits du gène ARNr 16S, pour une seule réaction, ont été : 15.675 µL d'eau pure et stérile, 5 µL de tampon 5X *Qiagen OneStep RT*, 1 µL de *Qiagen OneStep RT dNTP Mix* 10 mM, 0.625 µL de BSA (20 mg/mL), 0.05 µL d'amorce sens (100 µM), 0.05 µL d'amorce anti-sens (100 µM), 0.3 µL de PNA-CHLORO 100µM, 0.3 µL de PNA-MITO 100µM, 1 µL de *Qiagen OneStep RT Enzyme Mix* et 1 µL d'ARN. Le volume final de chaque réaction a été 25 µL. L'ajout de PNA-CHLORO et de

PNA-MITO a permis d'éviter l'amplification des traces d'ADN génomique possiblement présentes dans l'ARN (malgré les traitements avec l'enzyme DNase). Brièvement, une sonde spécifique (*Peptide nucleic acid (PNA) inhibitor probe*) s'est hybridée à l'ADN génomique à une température plus élevée que l'appariement des amorces (Bender *et al.*, 2007). Ainsi, l'amplification de l'ADN génomique a été bloquée. Les conditions thermocycliques de la RT-PCR des transcrits du gène ARNr 16S ont été : 30 minutes à 50°C (réaction RT), 15 minutes à 95°C (activation de la polymérase), 45 secondes à 95°C 25x (Dénaturation), 10 secondes à 78°C 25x (appariement de la sonde PNA), 60 secondes à 55°C 25x (appariement des amorces), 90 secondes à 72°C 25x (élongation), 7 minutes à 72°C (élongation finale) et les réactions ont été maintenues à 4°C.

RT-PCR pour amplifier les transcrits de la région ITS2

Les volumes utilisés pour la RT-PCR des transcrits de la région ITS2, pour une seule réaction, ont été : 16.075 µL d'eau pure et stérile, 5 µL de tampon 5X *Qiagen OneStep RT*, 1 µL de *Qiagen OneStep RT dNTP Mix* 10 mM, 0.625 µL de BSA (20 mg/mL), 0.15 µL d'amorce sens (100 µM), 0.15 µL d'amorce anti-sens (100 µM), 1 µL de *Qiagen OneStep RT Enzyme Mix* et 1 µL d'ARN. Le volume final de chaque réaction a été 25 µL. Les conditions thermocycliques de la RT-PCR des transcrits de la région ITS2 ont été : 30 minutes à 50°C (réaction RT), 15 minutes à 95°C (activation de la polymérase), 30 secondes à 95°C 30x (Dénaturation), 30 secondes à 45°C 30x (appariement des amorces), 30 secondes à 72°C 30x (élongation), 7 minutes à 72°C (élongation finale) et les réactions ont été maintenues à 4°C.

RT-PCR pour amplifier les petits ARNs

Les bibliothèques pour le séquençage de miARNs ont été préparées avec *NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Kit for Illumina® de NEB* en suivant les directives du fournisseur et en utilisant les adaptateurs de *TruSeq*.

3.3 Étiquetage taxonomique des amplicons (ARNr 16S et ITS2)

Les données de séquençage des amplicons des transcrits des gènes de l'ARNr 16S et de la région ITS ont été traitées dans le pipeline *AmpliconTagger* (Tremblay & Yergeau, 2019). Ce pipeline a regroupé les séquences en *amplicon sequence variants* (ASVs) (séquences identiques à 100%) et a identifié leur taxonomie correspondante (obtenue grâce au logiciel RDP classifier et SILVA (Wang *et al.*, 2007; Vilo & Dong, 2012; Quast *et al.*, 2013)). Brièvement, les *reads* de 250 paires de bases et d'une qualité d'au

moins 33 ont été gardées pour les traitements ultérieurs. Les contaminants de séquençage (artéfacts d'Illumina et séquences PhiX) ont été éliminés avec *bbduk* (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Les codes-barres et *reads* non-appariées ont également été enlevés. Les *reads* appariées ont ensuite été séparées et la qualité a été vérifiée. Les *reads* ont été coupées (l'extrémité 3' préférablement), assemblées (Magoč & Salzberg, 2011) et les amorces ont été enlevées. Les séquences gardées ont été celles avec une qualité supérieure ou égale à 25, aucune base ambiguë (N) et moins que 30 bases ayant une qualité (phred Qscore) inférieure à 15. Les *reads* plus petites que 50pb (pour les transcrits de la région ITS2) et plus petites que 100pb (pour les transcrits du gène ARNr 16S) ont été enlevées. DADA2 a permis le groupement (*clustering*) des ASVs (Callahan *et al.*, 2016). DADA2 a utilisé un algorithme se basant sur un modèle d'erreur paramétrique afin de déterminer le modèle d'erreur caractérisé par les données de séquençage. À partir de ce modèle, DADA2 a déduit les ASVs avec l'algorithme nommé *the core sample inference algorithm*. Les *reads* ont ensuite été appariées et le tableau des ASVs a été généré. Les chimères ont été identifiées parmi les ASVs grâce à la version d'*UCHIME denovo* et *UCHIME reference* de VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016). Les *clusters* ayant moins que 25 *reads* ont été rejetés. La taxonomie a été ajoutée aux ASVs en les comparant à RDP classifier (Wang *et al.*, 2007) supplémenté avec la base de données SILVA (Quast *et al.*, 2013) (<https://github.com/jtremblay/RDP-training-sets> et <https://github.com/jtremblay/RDP-training-sets>).

Le séquençage a identifié 14 186 080 *reads* pour les amplicons des transcrits du gène ARNr 16S. Après la suppression des *reads* contaminées par PhiX (un contrôle de qualité et de calibration durant le séquençage) et celles ne passant pas le seuil de qualité, 7 028 075 *reads* ont été retenues pour le regroupement des ASVs. 4 057 474 séquences ont été regroupées en 6 730 ASVs. Pour les amplicons de la région ITS2, 13 077 264 *reads* ont été obtenues. 6 446 300 *reads* ont été retenues après avoir enlevé celles contaminées et celles de qualité moindre. Le regroupement final en ASVs s'est produit avec 4 445 058 séquences classées dans 9 731 taxons.

3.4 Classification des miARNs et identification de leurs cibles bactériennes

Afin d'associer les résultats du séquençage des petits ARNs à un miARN précis, 3 méthodes ont été utilisées. Chacune d'elle reposait sur un prétraitement permettant le nettoyage bioinformatique des séquences, la vérification de la qualité et la sélection de taille (Figure 3.4). Brièvement, l'étape de prétraitement a utilisé *Trimmomatic* (Bolger, Lohse & Usadel, 2014) avec les paramètres suivants : *Illumina clip setting* :5:10:4. Ensuite, les contaminants de séquençage tels que les artéfacts d'Illumina et les contaminants PhiX ont été enlevés avec *bbduk* (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Les *reads* ont été filtrées pour garder les petites séquences entre 18 et 27 paires de bases. La méthode *De Novo Sub* a plus précisément supprimé les *reads* correspondant à la base de données RFAM (toutes les bases de données sauf celles des miARNs) et la base de données 5S (en employant les paramètres *mismatch=3* et *seed=5* avec *BWA aln*). Dans la méthode *De Novo*, les étapes ont été identiques à l'exception que les *reads* n'ont pas été alignées contre la base de données 5S. Pour la méthode *Référence*, les *reads* ont été alignées contre le génome d'*Arabidopsis* (TAIR10/GCA_000001735.1) ou de *Brachypodium* (bd21/GCF_000005505.1). Les bases de données génomiques correspondent aux génomes utilisés dans miRBase. L'alignement s'est effectué avec les paramètres *BWA aln mismatch=1* et *seed=5*. Enfin, les potentiels miARNs retenus pour chacune des méthodes ont été alignés (BLASTn) contre la base de données *miRBase hairpin* et *miRBase mature* en employant *word_size=5*. Les résultats BLASTn ont été filtrés pour conserver les séquences ayant au moins 18 paires de bases, ≤ 3 mésappariements et un pourcentage d'identité globale $\geq 85\%$. Pour maximiser le nombre de miARNs retenus pour la suite des analyses, les résultats des trois méthodes ont été considérés. Une fois les miARNs identifiés, ceux retrouvés parmi les témoins non-plantés ont été soustraits du tableau des données. En fait, puisque cette étude s'est dévouée à l'analyse des miARNs relâchés par les plantes, ceux retrouvés dans le sol non-planté n'ont pas été d'intérêt.

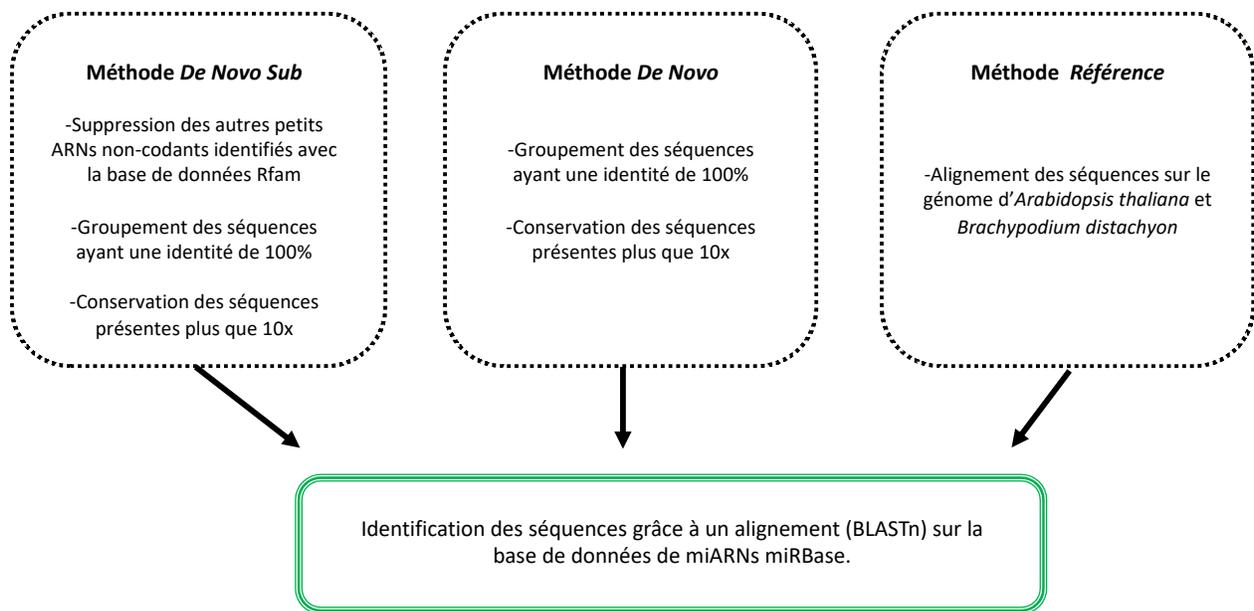


Figure 3.4 : Schématisation des 3 méthodes utilisées pour identifier les miARNs.

psRNATarget: *a plant small RNA target analysis server* a été utilisée pour comparer les miARNs à une banque de données des bactéries du sol (RefSoil Database : https://figshare.com/articles/dataset/RefSoil_Database/4362812). Ensuite, les duos miARNs/cibles retenus ont respecté les critères suivants : avoir moins que 6 mésappariements, avoir moins que 4 mésappariements consécutifs, n'avoir aucun mésappariement parmi les paires de bases situées entre les positions 9 et 13 de la séquence de miARN (Devi *et al.*, 2019). Les duos conservés pour les recherches taxonomiques avec BLASTn ont eu un Expectation < 2.

3.5 Mesure du pH du sol éloigné

Les échantillons de sol éloigné ont été séchés à 54°C pour 4 jours. Ensuite, ils ont été tamisés à 2mm et pesés. Environ 2g de chaque échantillon ont été placés dans un tube de 15 mL (un tube pour chaque échantillon). 4 mL d'une solution 0.01M de CaCl₂ ont été ajoutés dans chaque tube. Les échantillons ont été mélangés pendant 30 minutes sur un rotateur. Ensuite, les tubes ont été retirés du rotateur et laissés à sédimenter pendant une heure. Le pH a ensuite été pris avec un pH-mètre calibré en submergeant l'électrode dans le surnageant clair. Pour chaque échantillon, 3 mesures de pH ont été prises (Annexe S1.5). À noter un témoin avec du 0.01M de CaCl₂ a également été mesuré.

3.6 Analyses statistiques

Afin de traiter statistiquement le tableau des abondances de plus de plusieurs variables réponses (les groupes de miARNs et les ASVs) et plusieurs variables qualitatives : Plantes (*A. thaliana* et *B. distachyon*), Fertilisants (Acides aminés, NH_4NO_3 et aucun ajout d'azote), Compartiments (sol éloigné, endosphère et rhizosphère) et Blocs (1 à 5) la transformation des abondances en abondances relatives a été effectuée afin de contrôler la profondeur du séquençage. En fait, l'efficacité du séquençage peut varier d'un échantillon biologique à l'autre. En transformant les abondances de séquences en abondances relatives (nombre de séquences du miARN ou de l'ASV X / nombre totale de séquences retrouvées pour l'échantillon Y), le biais de séquençage a été réduit. La transformation de Hellinger a généré des abondances relatives et dans un second temps, leur a appliqué une racine carrée (Rao 1995; Legendre & Legendre 2012). Les statistiques utilisées pour les analyses des profils des miARNs et des microorganismes ont été des analyses multivariées en raison de la présence de plusieurs variables réponses (Annexe Tableaux S1.1 à S1.3). En fait, les abondances relatives de chaque groupe de miARN et de chaque ASV ont été considérées comme des variables réponses.

PERMANOVA : analyse de la variance multivariable permutationnelle

L'analyse de la variance multivariable permutationnelle, aussi nommée PERMANOVA, est un test statistique permettant d'évaluer les effets de plusieurs variables sur l'entièreté d'un réseau d'espèces ou dans le cas présent, le profil complet de miARNs/ASVs (Anderson 2001; Anderson & Walsh 2013; Anderson 2017). Ce test est non-paramétrique le rendant idéal pour les données d'abondances caractérisées par une distribution biaisée causée par l'absence de plusieurs taxons/groupes (inflation des zéros) parmi les échantillons. Dans ces cas, la PERMANOVA est à favoriser plutôt que la *multivariate analysis of variance* (MANOVA) qui assume la normalité multivariée (Anderson 2001). La seule condition d'application de la PERMANOVA est l'échangeabilité des rangées de la matrice impliquant l'indépendance des échantillons et une similitude concernant leurs distributions (Anderson 2001). La PERMANOVA est une analyse pour les données multivariées et non-paramétriques s'inspirant de l'ANOVA. Ce test a été effectué à partir de la matrice de dissimilarité (matrice D). Pour préciser, avec la matrice des abondances transformées par la méthode Hellinger (Annexe Tableaux S1.1 à S1.3), il a été possible de générer une matrice contenant des coefficients de dissimilarités/distances D par la méthode euclidienne. Les distances qui ont été obtenues se nomment distances de Hellinger. Cette matrice D a été insensible aux doubles-zéros. C'est-à-dire, les échantillons ayant eu des miARNs/ASVs absents en communs n'ont pas été considérés comme étant davantage similaires grâce à cette façon de calculer les distances. En bref,

la matrice D a été composée d'un coefficient de dissimilarité pour chaque paire d'échantillons. Deux échantillons possédant le même profil de miARNs en termes d'abondances transformées ont eu une dissimilarité de 0 alors que deux échantillons possédant un profil de miARNs complètement différents ont eu une dissimilarité de $\sqrt{2}$. La statistique découlée des PERMANOVAs a été une version multivariée du ratio F de Fisher (Anderson 2001). La fonction R utilisée a été adonis2 (Vegan) et la variable Bloc a été considérée comme une variable hiérarchique.

Analyses en coordonnées principales

Afin de visualiser l'influence des variables explicatives principales sur le profil de miARNs/d'ASVs (Annexe Tableaux S1.1 à S1.3), une analyse en coordonnées principales a été effectuée (ACoP). Cette analyse a permis d'apercevoir les échantillons plus dissimilaires et ceux qui le sont moins, car l'ACoP, effectuée avec la matrice contenant les distances de Hellinger, préserve les distances euclidiennes entre les échantillons (Legendre & Legendre, 2012). Effectivement, les coordonnées ont été calculées à partir de la matrice D pour générer l'ordination. À noter, l'axe de chacun des ACoPs a été comparé à la valeur prédite du modèle du bâton brisé afin d'assurer leur interprétabilité. Brièvement, le modèle du bâton brisé a brisé au hasard un bâton d'une longueur égale à 1 en autant de morceaux qu'il y a et de valeurs propres. Ensuite, chaque morceau a été placé en ordre décroissant. Les axes dont la valeur a été supérieure à celle du modèle du bâton brisé ont pu être interprétés (Borcard *et al.*, 2018).

Arbres de régressions multivariées (ARM)

La génération d'arbres de régressions multivariées (ARM) a permis le groupement hiérarchique par division des échantillons. Ce test a mené à l'identification des variables qui ont le plus influencé les profils des miARNs et des communautés microbiennes. Précisément, les échantillons ont été divisés en plusieurs groupes selon le critère de minimisation des sommes de carrés au sein des groupes (intra-groupes) (critère évaluant la dispersion des variables réponses) et selon les variables explicatives (De'ath 2002; Larsen & Speckman 2004; Legendre & Legendre 2012). Ainsi pour créer l'arbre, il a fallu une matrice de variables réponses et une matrice de variables explicatives. La matrice réponse a contenu les abondances relatives transformées des miARNs ou des ASVs (Annexe Tableaux S1.1 à S1.3) et la matrice de variables explicatives a été composée de trois colonnes (Plante, Fertilisants et Compartiments). Afin de trouver le meilleur partitionnement des échantillons, une validation croisée à ν -recouvrements a été utilisée où $\nu=10$. La validation croisée a permis de comparer des groupes tests avec des groupes d'apprentissages afin d'identifier le meilleur arbre; celui présentant la plus petite erreur relative de

validation croisée après un grand nombre d'essais (dans ce cas 500 pour le profil des miARNs ou 100 pour les données des ASVs) (Ouellette *et al.* 2012). La fonction utilisée a été `mvpart` (`mvpart` de CRAN).

Partitionnement de la variation

Le partitionnement de la variation de la matrice contenant les abondances relatives des ASVs a permis de constater l'influence de chacune des variables explicatives (Plantes, Fertilisants et Compartiments) sur le profil général des taxons microbiens (Annexe Tableaux S1.2 et S1.3). Précisément, la variance totale a été partitionnée en fractions contraintes et en fractions non-contraintes. Les fractions contraintes ont été exprimées en proportion ajustée équivalente au R^2 des régressions linéaires multivariées et elles ont représentées la variance de la matrice-réponse (Y) expliquée par les matrices explicatives (X) (Borcard *et al.*, 1992, Legendre & Legendre 2012, Borcard *et al.*, 2018). À noter, les matrices explicatives ont été recodées en variables binaires. Le R^2 ajusté est celui obtenu grâce à une analyse de redondance (RDA). La fonction utilisée dans R a été `varpart` (Vegan).

Test H non-paramétrique Kruskal-Wallis

Le test H non-paramétrique Kruskal-Wallis (ANOVA unidirectionnelle sur rangs) a permis de vérifier si l'abondance relative transformée (Hellinger) des miARNs a différencié significativement entre les types de fertilisants. Le test H de Kruskal-Wallis a été sélectionné, puisque les abondances relatives des miARNs n'ont pas répondu aux critères de l'ANOVA (normalité et homoscedasticité). Le test H a vérifié si la médiane de l'abondance relative d'un miARN a été significativement différente entre au moins deux des traitements fertilisants. Afin de savoir quel.s traitement.s a ou ont été différent.s, le test de `pairwise.wilcox.test` (`stats`) a été effectué avec une correction pour diminuer le taux de fausses découvertes. Lors de comparaisons multiples, il faut effectuer une correction autrement les chances de rejeter l'hypothèse nulle augmentent (erreur de type I).

Test Chi-carré d'indépendance

Le test Chi-carré d'indépendance a permis de vérifier si les fertilisants ont eu un impact au niveau de la présence-absence de chaque miARN (Annexe Tableau S1.4). Ce test a vérifié l'existence d'une association entre la présence ou l'absence d'un miARN et le traitement fertilisant. En fait, le test a mesuré la différence entre l'effectif observé et l'effectif attendu selon l'hypothèse que les fertilisants n'ont pas influencé la présence ou l'absence des miARNs.

Corrélations de rang de Spearman

Afin de repérer les tendances significatives entre les abondances des miARNs (Annexe Tableau S1) et les abondances des microorganismes (Annexe Tableaux S1.2 et S1.3), les corrélations de Spearman (version non-paramétrique des corrélations de Pearson) ont été privilégiées en raison de leur flexibilité. En fait, ces corrélations ne cherchent pas des tendances linéaires significatives, mais plutôt la force et la direction des associations entre deux variables (Spearman, 1904). Voilà pourquoi ce test a été sélectionné pour repérer les microorganismes qui ont potentiellement répondu à l'abondance relative des miARNs.

4 RÉSULTATS

4.1 Analyses statistiques du profil général des miARNs

L'ensemble des analyses s'est réalisé sur 5 blocs, les autres blocs n'ont pas été retenus en raison d'un manque de données (les blocs ayant des pots avec des plantes avec une croissance anormalement tardive ont été retirés des analyses à venir). Selon le séquençage des petits ARNs, le nombre de groupes de miARNs différents trouvés pour chacune des méthodes, après avoir enlevé les miARNs identifiés dans les témoins non-plantés, a été : Méthode *De Novo Sub*: 300 groupes, Méthode *De Novo* : 377 groupes, Méthode *Référence A. thaliana* : 157 groupes et Méthode *Référence B. distachyon* : 128 groupes (Tableau 4.1). La méthode *De Novo* a été sélectionnée pour la suite des analyses, car sa performance d'identification des miARNs a surpassé celle des autres. Afin de traiter statistiquement le tableau composé de 1) 377 groupes de miARNs et leur abondance respective et 2) plusieurs variables qualitatives : Plantes (*A. thaliana* et *B. distachyon*), Fertilisants (acides aminés, NH_4NO_3 et aucun ajout d'azote), Compartiments (sol éloigné, endosphère et rhizosphère) et Blocs (1 à 5), une analyse de variance multivariable permutacionnelle sur la distance Hellinger a été la méthode privilégiée.

Chaque groupe de miARNs a eu une abondance relative correspondante. Ainsi, chaque échantillon a pu être caractérisé par un profil d'abondances relatives des différents groupes de miARNs (Annexe Tableau S1.1). Pour avoir un aperçu des différents profils caractérisant chaque échantillon, des analyses à coordonnées principales (ACoPs) ont été effectuées. Les ordinations ACoPs (Figure 4.1) ont démontré un groupement des échantillons endosphériques, impliquant que le compartiment endosphérique a été caractérisé par un profil unique de miARNs. Une différence au niveau des profils de miARNs entre *A. thaliana* et *B. distachyon* a été constatée entre l'endosphère des deux plantes et entre la rhizosphère/sol éloigné des deux plantes. Un regroupement des échantillons n'a pas été remarqué selon les traitements fertilisants.

Tableau 4.1 : Nombre de groupes différents de miARNs d'*A. thaliana* et *B. distachyon* identifiés selon les 3 différents compartiments échantillonnés.

	miARNs endosphériques	miARNs rhizosphériques	miARNs du sol éloigné
Méthode <i>De Novo Sub</i> : 300			
Total	300	106	93
<i>A. thaliana</i>	214	80	80
<i>B. distachyon</i>	179	46	25
En commun	93 (31.00%)	20 (18.86%)	12 (12.90%)
Méthode <i>De Novo</i> : 377			
Total	373	199	178
<i>A. thaliana</i>	291	168	158
<i>B. distachyon</i>	282	115	62
En commun	200 (53.62%)	84 (42.21%)	42 (23.60%)
Méthode <i>Référence</i> : 157			
<i>A. thaliana</i>	145	72	76
Méthode <i>Référence</i> : 128			
<i>B. distachyon</i>	124	39	18

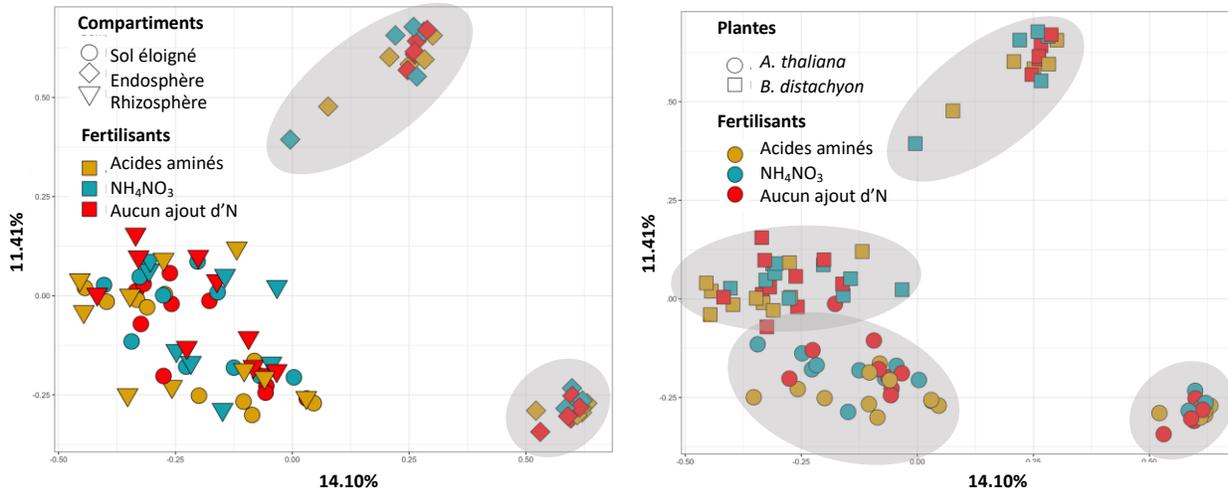


Figure 4.1 : Analyses en coordonnées principales (ACoPs) sur la distance Hellinger des miARNs identifiés à partir de la Méthode *De Novo*. Chaque point représente le profil de miARNs (la diversité des miARNs) qui caractérise un échantillon. Les deux graphiques sont identiques à l'exception de la forme des points : le graphique de gauche démontre les différents compartiments et le graphique de droite démontre les différentes plantes. Les cercles gris permettent de mieux discerner les groupements des échantillons selon les compartiments et les plantes.

L'ARM ($R^2= 0.308$) (Figure 4.2) a confirmé et a précisé, les constats obtenus par les ACoPs. Les échantillons prélevés de l'endosphère ont eu un profil de miARNs différent de ceux de la rhizosphère et du sol éloigné. Ensuite, les profils de miARNs se sont distingués entre *A. thaliana* et *B. distachyon*.

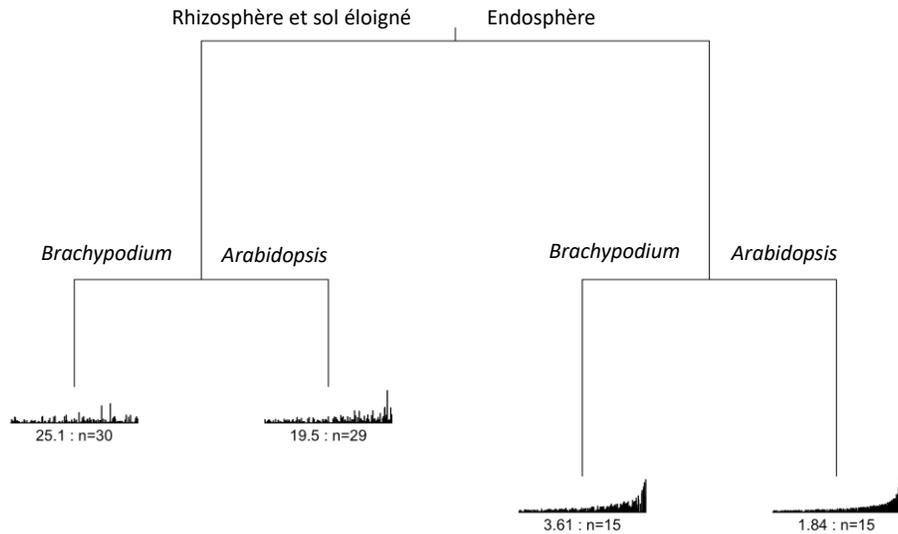


Figure 4.2 : Arbre de régression multivariable (ARM) généré à partir des abondances relatives des miARNs (500 essais). À chaque embranchement se trouve la somme des erreurs au carré du groupe (critère évaluant la dispersion des variables réponses) et le nombre d'objets au sein du groupe (n) (Legendre & Legendre, 2012). L'histogramme est composé des abondances relatives transformées des miARNs.

Les résultats des analyses de la variance permutative (Tableau 4.2) ont correspondu à ceux obtenus pour les ACoPs et les ARMs. En fait, le profil des miARNs a été significativement influencé par les compartiments échantillonnés et le type de plantes semées. Le compartiment a expliqué une plus grande proportion de la variation du profil. Voilà pourquoi les échantillons endosphériques ont été rassemblés dans un espace très restreint dans les ordinations ACoPs et que le premier embranchement des ARMs a séparé avant tout l'endosphère des deux autres compartiments. En sous-divisant les données selon chaque compartiment, les profils de miARNs se sont significativement distingués entre *A. thaliana* et *B. distachyon*. Les traitements azotés n'ont pas influencé significativement le profil des miARNs.

été possible d'identifier 11 miARNs (parmi les groupes identifiés dans le Tableau 4.1) potentiellement relâchés (trouvés dans la rhizosphère ou le sol éloigné) par les plantes en réponse aux fertilisants : bdi-miR156h-5p, ath-miR158b, ath-miR158a-3p, aof-miR159, bdi-miR159b-3-1, aly-miR161-5p.1, aof-miR166d, ath-miR396b-3p, ath-miR827, peu-miR2916 et ath-miR5642b (Annexe Tableaux S1.6 et S1.7). Les autres miARNs identifiés tels que hpo-mir-50, mle-mir-31, bta-mir-12036, mmu-mir-6236, bta-miR-2478 n'ont pas pu être considérés comme étant assurément produits par les plantes. La combinaison des trois traitements bioinformatiques a été entreprise pour maximiser l'effort d'identification des miARNs répondant significativement aux fertilisants.

Ensuite, les analyses de cibles bactériennes, effectuées avec le serveur psRNATarget, sur les miARNs identifiés par la combinaison des trois méthodes, ont révélés que 20 des 37 miARNs, retrouvés au niveau des racines, ont ciblé des gènes bactériens impliqués dans le cycle de l'azote. Or pour les miARNs retrouvés à l'extérieur des racines, cette proportion a été 10 sur 11. Les résultats du Tableau 4.3 ont montré qu'ath-miR158a-3p/ath-miR158b et ath-miR827 ont potentiellement ciblé des gènes de transporteurs/perméases d'acides aminés et ont répondu à la présence d'acides aminés. ath-miR5642b, a été davantage produit en présence du traitement aux acides aminés et a ciblé des gènes impliqués dans le cycle inorganique d'azote : des réductases de nitrite et des réductases d'oxyde nitreux. Trois miARNs ont répondu significativement à l'absence de fertilisation azotée: aof-miR166d, bdi-miR156h-5p, ath-miR396b-3p. Leurs cibles respectives ont peut-être été des gènes d'aminopeptidases, de transporteurs hydrophobes/amphiphiles efflux-1 et de transporteurs ABC. Dans ce contexte, les transporteurs généraux ont possiblement agi en tant que portes d'entrées ou de sorties pour les ressources azotées. Voilà pourquoi ils ont été considérés comme des gènes bactériens impliqués dans le cycle de l'azote. aof-miR159 et bdi-miR159b-3-1 ont été deux autres miARNs qui ont répondu aux acides aminés et leur cible ont été un gène de peptidase U32 ou de protéase. Dans cette expérience la famille 159 a été relâchée dans le sol éloigné par *A. thaliana* (majoritairement en présence du traitement aux acides aminés) et *B. distachyon* (majoritairement en présence des traitements au NH_4NO_3 et en carence d'azote). Enfin, peu-miR2916 a également été relâché par les deux plantes modèles et a ciblé des gènes de peptidases ou de protéases Clp de plusieurs taxons bactériens. L'abondance relative du peu-miR2916 a été favorisée par le traitement au NH_4NO_3 . Dix genres bactériens ont été ciblés par les miARNs du Tableau 4.3. Quoique aly-miR161-5p.1 a répondu significativement aux traitements azotés, ce miARN n'a pas semblé cibler un gène impliqué dans le cycle de l'azote. Par ailleurs, l'abondance relative d'aly-miR161-5p.1 a adopté un comportement particulier :

au niveau de la rhizosphère ce miARN a été exclusivement trouvé parmi le traitement aux acides aminés et au niveau du sol éloigné, ce miARN a été presque uniquement trouvé parmi les échantillons traités au NH_4NO_3 .

Tableau 4.3 : Cible des miARNs réagissant significativement aux traitements expérimentaux

miARNs	Bactérie ciblée	Gène-cible	Abondance relative
bdi-miR156h-5p	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	transporteur hydrophobe/amphiphile efflux-1	Plus élevée en carence d'azote
ath-miR158b ath-miR158a-3p	<i>Bacillus subtilis</i>	perméase d'acides aminés	Plus élevée en présence du traitement aux acides aminés
aof-miR159	<i>Bacillus sp</i>	peptidase U32 ou protéase (<i>collagenase-like</i>)	Dans le sol éloigné d' <i>Arabidopsis</i> , plus élevée en présence du traitement aux acides aminés
bdi-miR159b-3-.1	<i>Bacillus sp</i>	peptidase U32 ou protéase (<i>collagenase-like</i>)	Dans le sol éloigné de <i>Brachypodium</i> , plus élevée en présence des traitements au NH_4NO_3 et en carence d'azote
aof-miR166d	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	aminopeptidase	Plus élevée en carence d'azote
ath-miR396b-3p	<i>Bacillus lehensis</i>	transporteur ABC	Plus élevée en carence d'azote
ath-miR827	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	transporteur d'acides aminés ramifiés	Plus élevée en présence du traitement aux acides aminés
peu-miR2916	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Micromonospora Saccharothrix syringae</i>	plusieurs peptidases	Plus élevée en présence du traitement au NH_4NO_3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	protéase Clp	
ath-miR5642b	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	réductase de nitrite (NO_2^-)	Plus élevée en présence du traitement aux acides aminés
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	réductases d'oxyde nitreux (N_2O).	

aly-miR161-5p.1 est absent du tableau, car aucune gène liée au cycle d'azote a été identifié comme une cible.

Puisque le traitement au NH_4NO_3 est caractérisé par un pH plus acide, des corrélations de Spearman ont été réalisées afin de repérer les miARNs dont l'abondance a été corrélée significativement au pH (Tableau 4.4). En retenant seuls les miARNs identifiés chez les plantes, 6 ont été corrélés significativement au pH : aof-miR166c, aof-miR166d, lja-miR166-3p, vca-miR528-5p, peu-miR2916 et ptc-miR6478. Parmi les miARNs qui ont également répondu aux fertilisants, 2 ont été corrélés significativement au pH: aof-miR166d et peu-miR2916. De manière plus générale, les profils de miARNs n'ont pas changé significativement en fonction du pH (Annexe Tableaux S1.8 et S1.9).

Tableau 4.4: Abondances relatives des miARNs significativement corrélées au pH.

Méthodes	Corrélations de Spearman	
DE NOVO SUB		
	miARN	valeur p
Sol éloigné	aof-miR166c	0.02280606
	aof-miR166d	0.03480379
Tout	vca-miR528-5p	0.04485181
<i>A. thaliana</i>	hpo-miR-50	0.009829625
	lja-miR166-3p	0.04383413
<i>B. distachyon</i>	vca-miR528-5p	0.0386775
	hpo-miR-50-5p	0.007829071
DE NOVO		
Sol éloigné		
Tout	aof-miR166c	0.02635788
	aof-miR166d	0.04377284
	ptc-miR6478	0.007625053
	vca-miR528-5p	0.04485181
	peu-MIR2916	0.006818532
	peu-MIR2916	0.01540394
	mmu-mir-5108	0.03840677
	mmu-mir-6236	0.0359307
	pxy-mir-6497	0.03981329
	mmu-mir-6240	0.004111363
<i>A. thaliana</i>	aof-MIR166c	0.03402486
	aof-miR166d	0.00016999
	peu-MIR2916	0.04444261
	mmu-mir-6240	0.04088392
<i>B. distachyon</i>	vca-miR528-5p	0.0386775
	pxy-mir-6497	0.0386775
RÉFÉRENCE		
Sol éloigné		
<i>A. thaliana</i>		n.s.
<i>B. distachyon</i>		n.s.

Les miARNs en gras et soulignés sont également corrélés avec les traitements fertilisants azotés. n.s : non-significatif.

La majorité des miARNs trouvée à l'extérieur des racines a été issue de la rhizosphère ou du sol éloigné de pots semés avec *A. thaliana*. Deux familles de miARNs exsudés ont été trouvés en commun entre les plantes modèles : miR159/miR159-3.-1 et miR2916 (Figure 4.3).

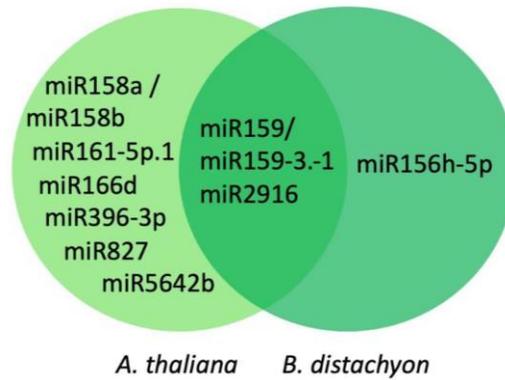


Figure 4.3 : Provenance des miARNs trouvés à l'extérieur des racines entre les pots plantés avec *A. thaliana* et *B. distachyon*.

Grâce au serveur psRNAtarget, les séquences, des miARNs dérivés des plantes, ont été alignées avec les génomes de la base de données des bactéries du sol (RefSoil Database) en suivant les critères énumérés dans la méthodologie. Les fonctions des gènes et l'appartenance taxonomique de ces gènes identifiés comme cibles possibles des miARNs ont été répertoriées. Les miARNs ont parfois ciblé plus d'un gène chez un genre bactérien. Parfois, le gène ciblé a également été trouvé chez plusieurs genres bactériens. Les taxons les plus fréquemment ciblés ont été *Bacillus/Amphibacillus/Paenibacillus*, *Candidatus Solibacter*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas/Rhodopseudomonas*, *Rhizobium/Bradyrhizobium* et *Desulfosporosinus* (Figure 4.4). La Figure S1.2 (Annexe) a révélé que les miARNs ont ciblé plus de taxons uniques que de taxons partagés. Les miARNs bdi-miR156h-5p, ath-miR158a/ath-miR158b, aof-miR159/bdi-miR159b-3p.1, aly-miR161-5p.1 et ath-miR396b-3p ont ciblé moins que cinq genres bactériens alors que les autres miARNs (aof-miR166d, ath-miR827, peu-miR2916 et ath-miR5642b) ont ciblé au moins treize taxons différents chaque.

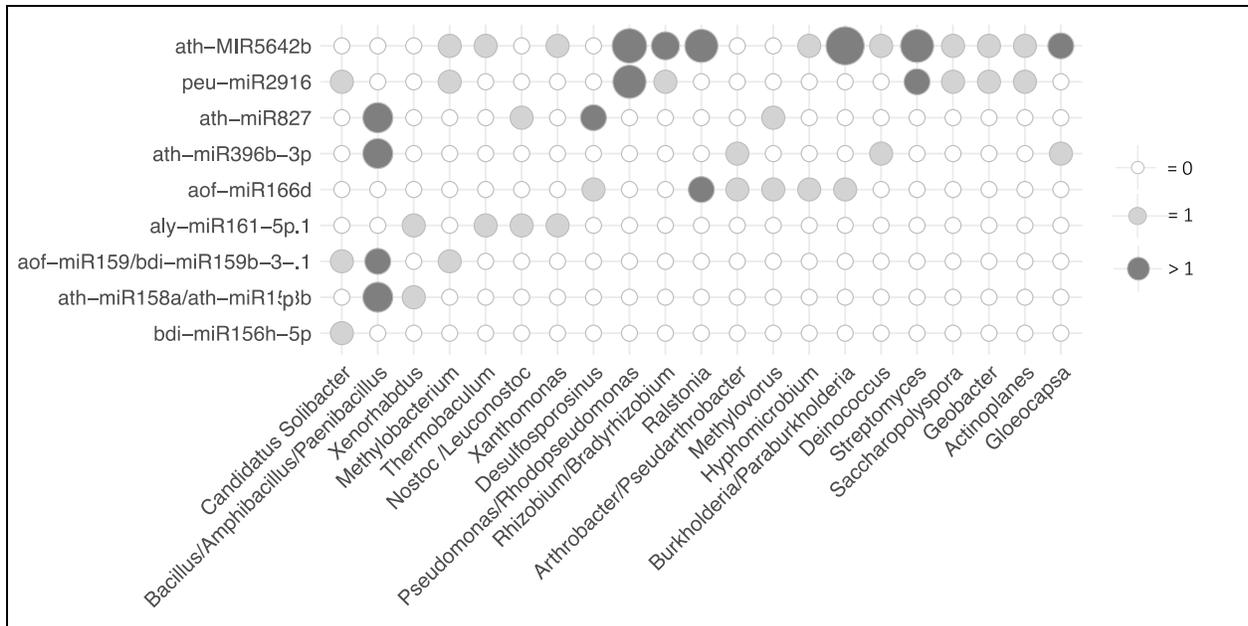


Figure 4.4 : Genres bactériens ciblés par au moins 2 miARNs répondant aux fertilisants. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de fois que le taxon a été ciblé.

Les miARNs répondant significativement à l'azote ont ciblé plus que juste les gènes compilés dans le Tableau 4.3. Les fonctions bactériennes les plus ciblées ont été les activités régulatrices (transcription), les transférases (incluant les kinases), les hydrolases (incluant les protéases et peptidases considérées comme des gènes impliqués dans le cycle de l'azote), les transporteurs (incluant les transporteurs généraux puis les transporteurs et perméases d'acides aminés) et les protéines membranaires et structurales (Figure 4.5). Ensemble les deux figures ont révélé certains miARNs avec des cibles taxonomiques et fonctionnelles générales (ath-miR5642b, peu-miR2916 et aly-miR161-5p.1) et d'autres miARNs avec des cibles plus spécifiques (bdi-miR156h-5p, ath-miR158a/ath-miR158b et aof-miR159/bdi-miR159b-3p.1).

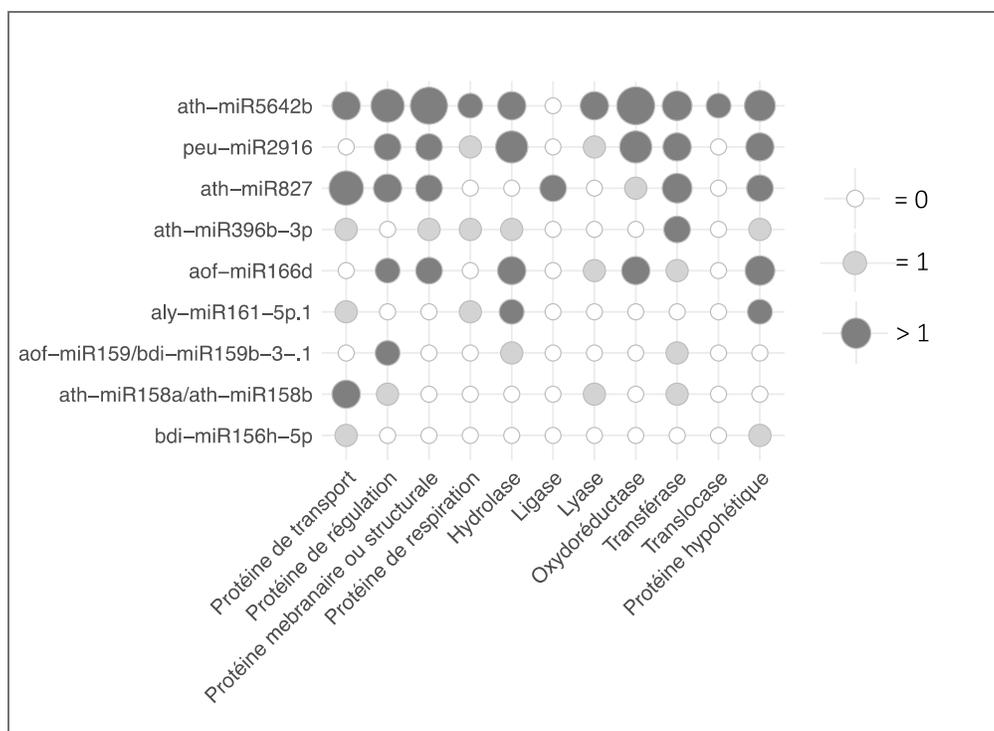


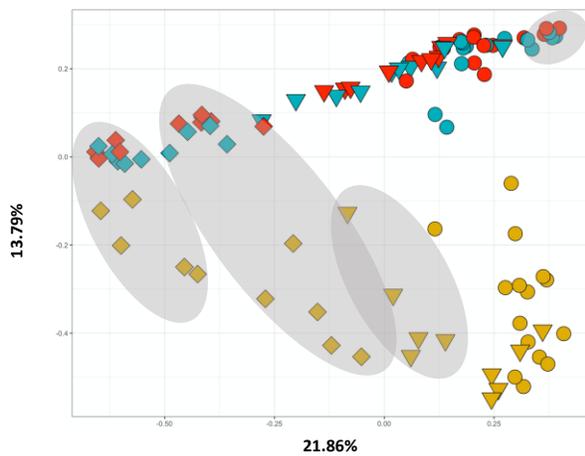
Figure 4.5 : Fonctions bactériennes générales ciblées par les miARNs répondant aux fertilisants. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de fois que la fonction a été ciblée.

4.3 Caractérisation du profil général du microbiote

Pour caractériser les communautés microbiennes, les données utilisées ont été celles obtenues à partir du séquençage des amplicons des transcrits du gène ARNr 16S et de la région ITS2 et les étapes de nettoyage et étiquetage bioinformatique subséquentes. Les statistiques réalisées ont été les mêmes que celles employées pour caractériser le profil des miARNs: ACoPs, ARMs et l'analyse de la variance permutationnelle. Une analyse de la partition de la variation a également été réalisée. La distance de Hellinger a aussi été utilisée sur la matrice d'abondance des données de séquençage. L'ensemble des ASVs (séquences uniques) associé à leur abondance a créé un profil microbien utilisé lors des analyses (Annexe Tableaux S1.2 et S1.3). Ces analyses ont permis de caractériser les effets des variables explicatives: Plantes (*A. thaliana* et *B. distachyon*), Fertilisants (Acides aminés, NH_4NO_3 et aucun ajout d'azote), Compartiments (sol éloigné, endosphère et rhizosphère) et Blocs (1 à 5).

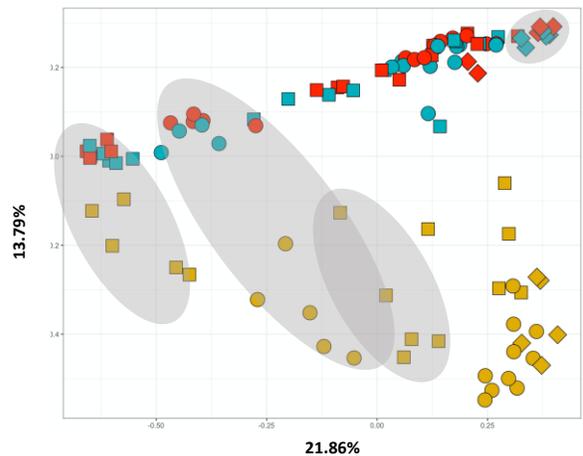
Les ACoPs des communautés bactériennes ont montré une influence prononcée du type de fertilisants. En fait, le traitement aux acides aminés a causé un changement communautaire (les points jaunes se sont séparés des autres sur la Figure 4.6). Par ailleurs, la communauté bactérienne a différencié selon le compartiment échantillonné. Le profil bactérien du sol éloigné et de la rhizosphère a été moins similaire de celui de l'endosphère. Ensuite, le type de plantes a également influencé la communauté bactérienne de l'endosphère. Les variables influençant davantage la communauté fongique ont été les compartiments (les échantillons provenant du sol éloigné se sont distingués de ceux de la rhizosphère et de l'endosphère) et le type de plantes (les témoins non-plantés ont eu un profil fongique moins similaire aux pots plantés). L'influence des fertilisants a été moins évidente sur la communauté fongique.

Les ARMs (Figure 4.7) ont clarifié les observations effectuées avec les ACoPs. La communauté bactérienne a différencié entre l'endosphère et les autres compartiments. Parmi les échantillons de l'endosphère, les profils bactériens se sont différenciés entre *A. thaliana* et *B. distachyon*. Les profils bactériens des échantillons de la rhizosphère et du sol éloigné se sont séparés en deux catégories : ceux traités aux acides aminés et les autres. L'ARM du profil bactérien ($R^2 = 0.452$) n'a pas identifié de différences au niveau de la communauté bactérienne des échantillons traités au NH_4NO_3 et ceux n'ayant eu aucun ajout d'azote. Pour la communauté fongique ($R^2 = 0.221$), les profils du sol éloigné se sont discernés, avant tout, des autres. L'ARM a par la suite identifié une différence communautaire entre l'endosphère et la rhizosphère. Puis, les échantillons du sol éloigné ont été caractérisés par une communauté différente entre les sols plantés et les sols non-plantés.



Compartiments
 ○ Sol éloigné
 ◇ Endosphère
 ▽ Rhizosphère

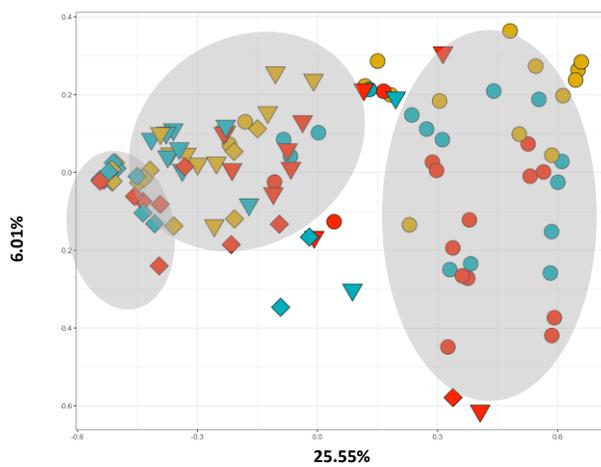
Fertilisants
 ■ Acides aminés
 ■ NH₄NO₃
 ■ Aucun ajout d'N



Plantes
 ○ *A. thaliana*
 □ *B. distachyon*
 ◇ Témoin

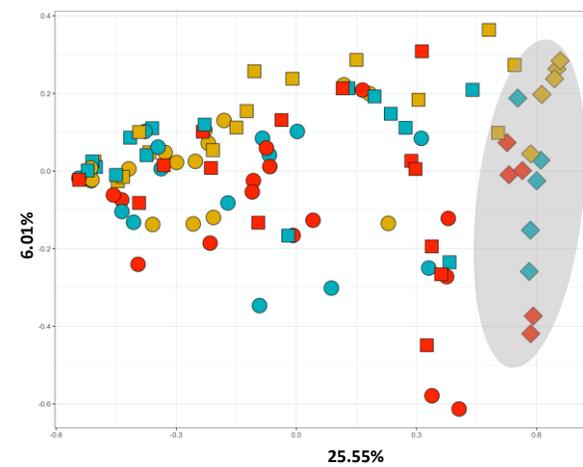
Fertilisants
 ■ Acides aminés
 ■ NH₄NO₃
 ■ Aucun ajout d'N

Communautés des
bactéries et des archées



Compartiments
 ○ Sol éloigné
 ◇ Endosphère
 ▽ Rhizosphère

Fertilisants
 ■ Acides aminés
 ■ NH₄NO₃
 ■ Aucun ajout d'N



Plantes
 ○ *A. thaliana*
 □ *B. distachyon*
 ◇ Témoin

Fertilisants
 ■ Acides aminés
 ■ NH₄NO₃
 ■ Aucun ajout d'N

Communautés fongiques

Figure 4.6 : Analyses en coordonnées principales (ACoPs) sur la distance Hellinger des abondances relatives des ASVs formant les communautés microbiennes. Chaque point représente le profil des microorganismes qui caractérise un échantillon. Les formes dans les graphiques à gauche démontrent les différents compartiments et les formes dans les graphiques à droite démontrent les différentes plantes. Les cercles gris permettent de mieux discerner les groupements des échantillons selon les compartiments et les plantes.

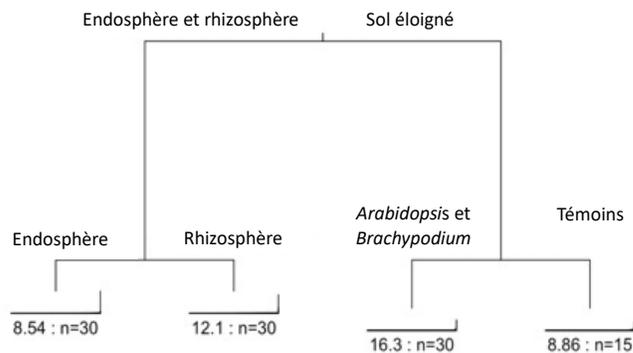
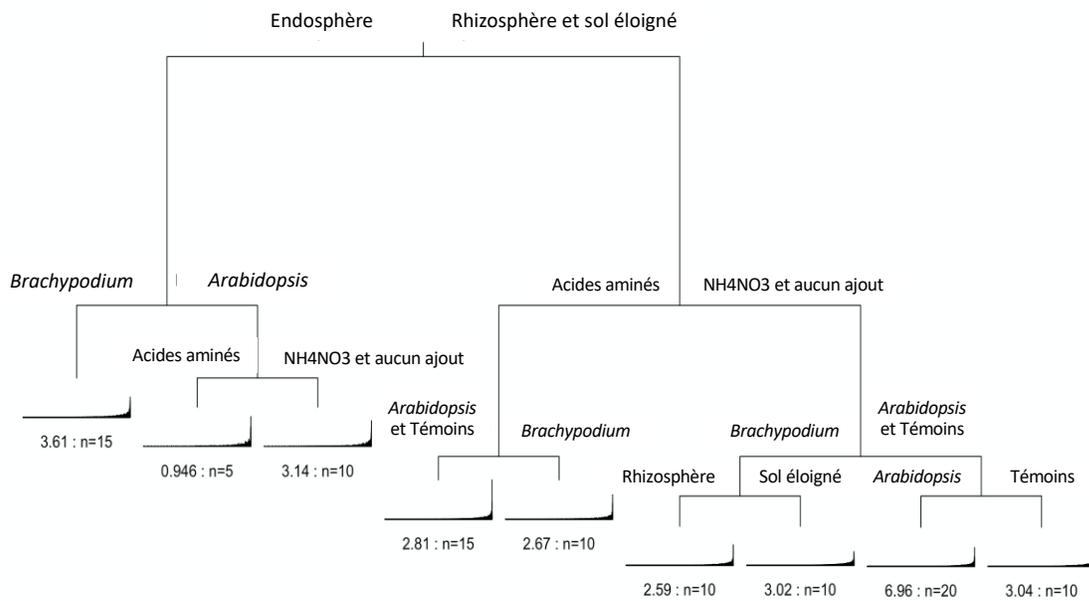


Figure 4.7 : Arbres de régressions multivariées (ARMs) générés à partir des abondances relatives du séquençage d'amplicons (100 essais). À chaque embranchement se trouve la somme des erreurs au carré du groupe (critère évaluant la dispersion des variables réponses) et le nombre d'objets au sein du groupe (n) (Legendre & Legendre, 2012). Les histogrammes sont composés des abondances relatives transformées des microorganismes.

Les résultats des analyses de la variance permutacionnelle ont confirmé que les variables Plantes et Compartiments ont influencé les communautés microbiennes. Les fertilisants ont influencé la communauté bactérienne au sein de tous les compartiments alors qu'ils n'ont qu'influencé la

communauté fongique de la rhizosphère et du sol éloigné (Annexe Tableau S1.10) La partition de la variation de la matrice contenant les abondances relatives des ASVs microbiens a permis de constater l'influence respective du type de plantes, des fertilisants et des compartiments sur la composition communautaire (Figure 4.8). Comme anticipé par les ACoPs et les analyses PERMANOVAs, les fertilisants ont influencé davantage la communauté des bactéries et des archées (partition de la variation = 13.68%) que la communauté fongique (partition de la variation = 1.99%). Pour les deux types de communautés, la plus grande partition de la variation a été expliquée par les compartiments échantillonnés.

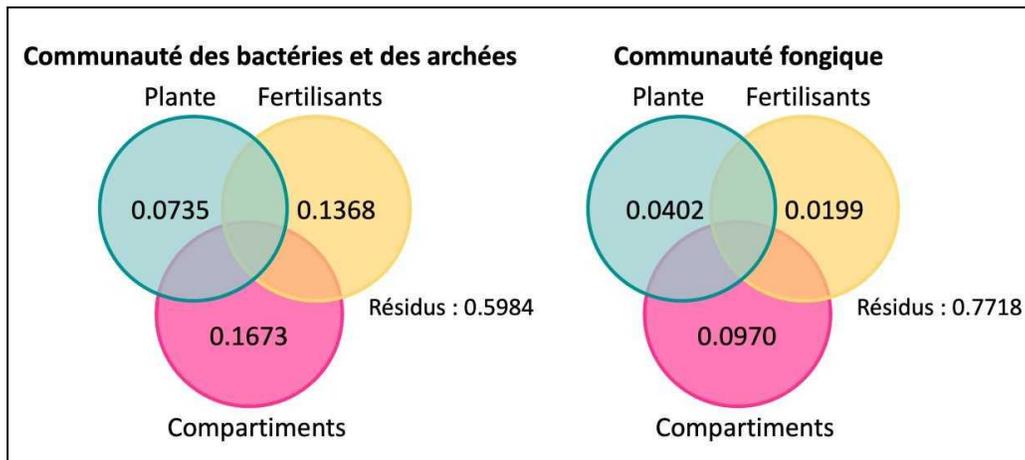


Figure 4.8 : Proportion de la variance du profil microbien expliquée par les différentes variables.

Puisque la communauté microbienne a changé en fonction des régimes fertilisants, il a fallu vérifier si une modification de pH a pu être en cause. Effectivement, les fertilisants inorganiques tels que le NH_4NO_3 peuvent changer le pH du sol. Le pH du sol éloigné a donc été mesuré (Annexe Tableau S1.5). Après vérification des suppositions, une ANOVA a été réalisée (Tableau 4.5). Le test post-hoc de Tukey pour la variable Fertilisants a mis en évidence la différence significative entre le pH du sol éloigné du traitement inorganique (NH_4NO_3) et les autres. En fait, le pH du sol traité au NH_4NO_3 a été significativement plus acide (moyenne 5.30) que les autres conditions (acides aminés moyenne 5.64 et aucun ajout d'N moyenne 5.58). Le pH du sol du bloc 1 a été significativement plus basique (moyenne 5.63) que le bloc 3 (moyenne 5.44). Le pH a également été significativement différent entre les pots semés avec *A. thaliana* (moyenne 5.58) et les pots non-plantés (moyenne 5.43). Afin de vérifier si le pH a influencé significativement les profils microbiens, des analyses PERMANOVAs (Tableaux 4.6 et 4.7) ont été réalisées. Les résultats ont révélé que le pH n'a pas modifié significativement les communautés bactériennes et fongiques du sol éloigné.

Tableau 4.5 : Résultats d'une ANOVA effectuée sur les données de pH du sol éloigné. pH ~ Fertilisants * Plante + Bloc.

Variables explicatives	F	valeur p
Fertilisants	24.610	4.72e-07 ***
Plante	3.945	0.0301
Bloc	3.939	0.0110 *
Fertilisants * Plante	0.450	0.7716

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$

Tableau 4.6 : Résultats d'une PERMANOVA effectuée sur les abondances relatives de la communauté bactérienne et d'archées pour vérifier si le pH peut expliquer le changement communautaire. Matrice D ~ Fertilisants * Plante * pH (9999 permutations).

Variables explicatives	F	R ²	valeur p
Fertilisants	7.4739	0.24994	0.0001 ***
Plante	2.6221	0.08769	0.0003 ***
pH	1.5374	0.02571	0.0639

Les autres interactions entre les variables n'ont pas été significatives. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$

Tableau 4.7: Résultats d'une PERMANOVA effectuée sur les abondances relatives de la communauté fongique pour vérifier si le pH peut expliquer le changement communautaire. Matrice D ~ Fertilisants * Plante * pH (9999 permutations).

Variables explicatives	F	R ²	valeur p
Fertilisants	1.9032	0.07875	0.0001 ***
Plante	2.9009	0.12003	0.0001 ***
pH	0.9212	0.01906	0.5982

Aucune interaction entre les variables n'a été significative. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$

4.4 Taxons microbiens corrélés aux miARNs répondant significativement aux fertilisants

La diminution significative de l'abondance relative de certains taxons en fonction de l'augmentation en abondance relative d'un miARN, pourrait s'expliquer par l'inhibition de l'expression d'un gène essentiel à la survie du microorganisme par le miARN. Ainsi, une autre façon de repérer des cibles microbiennes des miARNs, exsudés par les racines, a été de trouver les taxons dont l'abondance relative a semblé corrélée avec les abondances relatives des miARNs. Les corrélations de Spearman ont donc été réalisées entre les abondances relatives transformées (Hellinger) des miARNs (Annexe Tableau S1.1) potentiellement relâchés par les plantes à l'extérieur des racines et les abondances relatives transformées (Hellinger) des taxons microbiens (Annexe Tableaux S1.2 et S1.3). De façon générale, plusieurs des miARNs ont été corrélés positivement aux taxons *Haliangium*, *Opitutus* (phylum

Verrucomicrobia), *Cupriavidus*, *Sorangium*, Xanthomonadales, Sphingobacteriales et Rickettsiales (Annexe Tableau S1.11) Les ordres Oligoflexales, Myxococcales (l'ordre d'appartenance d'*Haliangium*) et la famille Tepidisphaeraceae ont souvent été corrélés (positivement ou négativement) avec l'abondance relative des miARNs. ath-miR5642b, peu-miR2916, aof-miR166d et ath-miR396b ont été corrélés positivement avec la famille *Chitinophagaceae*. ath-miR5642b, aof-miR166d ont été corrélés positivement avec le genre *Pseudomonas*. Les genres *Burkholderia* et *Paraburkholderia* ont été corrélés positivement avec ath-miR5642b et aof-miR159. ath-miR158a et peu-miR2916 ont été corrélés négativement avec le genre *Bryobacter*. La majorité des miARNs ont été corrélés positivement avec les taxons bactériens à l'exception et d'ath-miR158a dans la rhizosphère d'*A. thaliana*, d'aof-miR159 dans le sol éloigné d'*A. thaliana*, d'aly-miR161-5p.1 dans la rhizosphère d'*A. thaliana* traitée aux acides aminés et d'aly-miR161-5p.1 dans le sol éloigné d'*A. thaliana*.

Beaucoup moins de corrélations significatives ont été repérées entre l'abondance relative des miARNs et l'abondance relative des micromycètes (Annexe Tableau S1.12). L'abondance relative du genre *Mortierella* a été corrélée positivement aux abondances d'aof-miR166d et de peu-miR2916. Le genre *Archaeospora* a été corrélé positivement avec aof-miR166d. ath-miR5642b a été corrélé positivement avec le genre *Paraglomus*. Le genre *Unguiculariopsis* a été corrélé positivement avec ath-miR158b et ath-miR5642b. aof-miR166d a été corrélé positivement au genre *Bipolaris*. Les seules corrélations négatives détectées ont été entre aof-miR166d et Chytridiales, aof-miR166d et *Lobulomyces*, puis entre aly-miR161-5p.1 et *Holtermanniella*.

5 DISCUSSION

L'idée que certains miARNs peuvent se trouver au niveau de la rhizosphère et que certains miARNs exsudés par les plantes sont communs aux deux plantes a été validée. La supposition que certains miARNs rhizosphériques des plantes diffèrent selon les régimes d'azote a également été confirmée. Cependant, le profil des miARNs rhizosphériques n'a pas changé selon les traitements fertilisants. Les résultats ont démontré, comme anticipé, une influence du microbiote selon le type de plantes, les compartiments échantillonnés et les régimes fertilisants. Les changements se produisant au niveau du microbiote ont favorisé une évaluation précautionneuse des résultats concernant les corrélations entre les abondances des taxons microbiens et les abondances des miARNs. Par ailleurs, contrairement à mon hypothèse initiale, l'abondance de plusieurs taxons microbiens n'a pas été corrélée négativement à l'abondance des miARNs répondant significativement aux fertilisants. Ce résultat laisse croire que la compétition entre les microorganismes et la plante pour les ressources azotées, via l'exsudation de miARNs, est un processus complexe à l'échelle du microbiote. Pour vérifier si une modification du réseau microbien peut être engendrée par les miARNs inhibant certaines fonctions écologiques liées au cycle de l'azote; des expériences complémentaires seront nécessaires.

5.1 Caractéristiques générales du *miRNAbolome*

Les miARNs ont été trouvés dans le compartiment rhizosphérique suggérant ainsi que les miARNs détiennent un rôle dans les interactions plante-microbiote. Par ailleurs, plusieurs miARNs rhizosphériques ont été retrouvés à la fois chez *A. thaliana* et *B. distachyon* (18.86% pour la méthode *De Novo Sub* et 42.21% pour la méthode *De Novo*). Cette expérience a démontré que le relâchement de miARNs à l'extérieur des racines représente un phénomène partagé entre deux plantes phylogénétiquement distinctes. Une plus forte proportion de miARNs rhizosphériques, chez *A. thaliana*, a été constatée au niveau du sol éloigné. Cela a appuyé les observations obtenues lors de l'échantillonnage : le réseau racinaire d'*A. thaliana* était plus fin, mais plus répandu dans le pot conférant alors une relation plus étroite entre la rhizosphère et le sol éloigné que le réseau racinaire de *B. distachyon*.

Dans cette expérience, le profil général des miARNs n'a pas été influencé significativement par les fertilisants. En supposant que les miARNs exsudés interagissent continuellement avec le microbiote, il

est compréhensible que le profil général des miARNs n'a pas été changé par les fertilisants, car l'interférence avec l'utilisation microbienne des ressources azotées serait uniquement le rôle de certains miARNs. Les autres miARNs pourraient contribuer à la défense contre des phytopathogènes, à la résistance à la sécheresse, à l'assimilation de P, à la stabilisation de la communauté de décomposeurs, etc. Toutefois, le *miRNAbolome* a été significativement différent entre les compartiments et entre le type de plante. En fait, le profil des miARNs endosphériques s'est distingué considérablement du profil rhizosphérique et du sol éloigné. Il fallait s'y attendre, car les miARNs au sein des racines sont avant tout impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'hôte végétal ou de la niche microbienne endosphérique. Chez les plantes, plusieurs miARNs sont spécifiques à un organe (fleurs, feuilles, racines et graines) alors la différence entre l'endosphère et la rhizosphère était attendue (Meng *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017a). Par ailleurs, au sein de chaque compartiment, il a eu une différence significative entre le profil des miARNs caractérisant les pots plantés avec *A. thaliana* de ceux plantés avec *B. distachyon*. L'influence de la variable Plante a été plus prononcée au niveau de l'endosphère et son effet a diminué plus la distance d'échantillonnage s'est éloignée des racines. Les gènes codant les miARNs sont hautement conservés dans le règne végétal, en revanche il existe des miARNs non-conservés qui sont spécifiques à l'espèce ce qui pourrait expliquer les différences obtenues entre *A. thaliana* et *B. distachyon*. Parmi les miARNs qui ont été repérés hors des racines en réponse à l'azote, miR156, miR166, miR159 et miR396 sont hautement conservés, miR158 est bien conservé, miR161 est faiblement conservé et miR827 est conservé chez les angiospermes (miR2916 et miR5642b n'ont pas été trouvés dans les études) (Zhang *et al.*, 2006; Chávez Montes *et al.*, 2014).

5.2 Les miARNs répondant à l'azote et leur influence sur les microorganismes du sol

Chez *Arabidopsis*, le **miR156** peut augmenter la production d'anthocyanines protégeant la plante lors d'un stress où l'azote se trouve en quantité limitante (Gou *et al.*, 2011). En fait, il a été démontré que les plantes d'*Arabidopsis*, ayant une mutation dans la biosynthèse des anthocyanines ont un taux de survie plus faible lors d'une croissance en carence d'azote (Liang & He, 2018). Nos résultats ont repéré le miR156 dans la rhizosphère des pots plantés avec *B. distachyon* en réponse au traitement sans ajout d'azote. Les plantes de *Brachypodium* n'ont pas eu de signes visibles d'anthocyanines contrairement à celles d'*Arabidopsis*. Il a donc été curieux de trouver la réponse du bdi-miR156h-5p plus prononcé chez *Brachypodium*, mais une étude a montré que le blé (*Triticum aestivum* L. dans la même famille que *Brachypodium*) a connu une augmentation de la production racinaire du bdi-miR156h-5p en conditions N-limitées (Zhao *et al.*, 2015). Étonnamment, dans l'endosphère, miR156 n'a pas répondu

significativement au fertilisant dépourvu d'azote. Ainsi, au lieu de favoriser l'accumulation d'anthocyanines chez *B. distachyon*, l'action de ce miARN était possiblement d'empêcher les rhizobactéries d'acquérir l'azote en inhibant leur transporteur hydrophobe/amphiphile efflux-1.

Le **miR158** est impliqué dans la résistance aux stress abiotiques comme l'ont démontré des études sur le canola (*Brassica napus*) (Zhang *et al.*, 2018) et le citron (*Citrus sinensis*) (Liang *et al.*, 2017). Autrement, le miR158 est sous-exprimé en conditions limitées en P (Gu *et al.*, 2010). La réponse du ath-miR158b/ath-miR158a-3p vis-à-vis différentes circonstances environnementales explique peut-être pourquoi cette molécule a été trouvée dans les sols d'*A. thaliana* traités aux acides aminés. De plus les analyses de psRNAtarget ont entre autres prédit que ce miARN ciblait une perméase d'acides aminés ce qui a appuyé l'hypothèse générale stipulant que l'abondance relative des miARNs rhizosphériques ciblant les gènes bactériens responsables de l'acquisition d'acides aminés, allait être plus prononcée en présence d'acides aminés.

Chez *Triticum aestivum* L. le miR159b a été faiblement exprimé en situation limitante et non-limitant en azote ce qui laisse croire que ce miARN ne répond pas à l'azote (Zhao *et al.*, 2015). Le **miR159** est très conservé et abondant dans le règne végétal. Au sein de la plante, miR159 est très important pour le développement et cible plus précisément des gènes codant les facteurs de transcription R2R3 MYB qui transmettent le signal de la gibbérelline (une phytohormone favorisant la croissance des plantes) (Millar, Lohe & Wong, 2019). Donc, on pourrait s'attendre à ce que ce miARN soit présent de manière similaire entre les 3 conditions fertilisantes chez *Brachypodium*. Cependant, bdi-miR159b-3-1 a été trouvé majoritairement dans le sol éloigné de *Brachypodium* sous la fertilisation au NH_4NO_3 et celle sans ajout d'azote. Ainsi, la présence d'acides aminés a diminué la sécrétion de ce miARN hors des racines. De façon plus intrigante, une version quasi-identique (aof-miR159) a été trouvée dans le sol éloigné d'*A. thaliana* en réponse aux acides aminés. Plusieurs études démontrent que le miR159 détient un rôle important pour contrer les stress au sein des racines tels que la salinité (Kitazumi *et al.*, 2015), la sécheresse (López-Galiano *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2016) et les pathogènes fongiques (Zhang *et al.*, 2016a). Les quantités du miR159 lors d'expositions aux stress ont changé selon les espèces étudiées ce qui peut expliquer les divergences entre *A. thaliana* et *B. distachyon* dans cette étude (Millar, Lohe & Wong, 2019; Gao *et al.*, 2016; Cuperus, Fahlgren & Carrington, 2011). Par ailleurs, miR159 a été impliqué directement dans l'inhibition de la virulence d'un pathogène fongique chez le coton impliquant que cette famille de miARNs a la capacité d'interagir avec d'autres règnes (Zhang *et al.*, 2016a). Il est donc

possible que le miR159 répond à la présence de certains microorganismes, ainsi sa réponse aux fertilisants serait une conséquence indirecte.

Une étude sur l'interaction interrègne entre le **miR161** d'*Arabidopsis* et le phytopathogène *Phytophthora capsici* a trouvé que ce miARN a généré une accumulation de la production de petits ARNs secondaires chez *Arabidopsis* qui ont pu inhiber plusieurs gènes du pathogène (Ma *et al.*, 2016). Ces inhibitions ont conféré une résistance à l'infection. Par ailleurs, au sein d'*Arabidopsis* le miR161 régule plusieurs gènes de miARNs et modifie des cascades de régulation en inhibant les cibles de générer des tasiARNs (Meng *et al.*, 2012). Ainsi, l'effet d'aly-miR161-5p.1 est possiblement indirect expliquant pourquoi aucun gène lié au cycle de l'azote a été trouvé par les analyses des cibles bactériennes effectuées avec psRNAtarget.

Similairement au miR159, le **miR166** est bien conservé au sein du règne végétal, est caractérisé par une grande diversité fonctionnelle et est en mesure d'avoir des interactions interrègnes (Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016a). Le miR166d a surtout été trouvé dans la rhizosphère et le sol éloignée d'*Arabidopsis* traité sans ajout d'azote. Par l'inhibition de gènes codant pour les aminopeptidases, ce miARN peut possiblement ralentir l'assimilation des ressources azotées par les bactéries afin de favoriser l'acquisition d'azote par la plante en conditions N-limitées.

Les effets du **miR396b** sont bien reportés car cette famille est conservée et cible des facteurs régulant la croissance (*growth-regulating factors*). Les rôles de ce miARN sont vastes : répondre au stress chez le fruit du dragon (*Hylocereus polyrhizus*) (Li *et al.*, 2019a), conférer une tolérance au froid à certains agrumes (Zhang *et al.*, 2016b), développer l'embryon (Szczygieł-Sommer & Gaj, 2019), les feuilles (Mecchia *et al.*, 2013), la floraison (Yuan *et al.*, 2020) et la fructification (Cao *et al.*, 2016). En cas d'infection fongique chez *A. thaliana*, les niveaux de miR396 baissent afin de permettre l'expression des facteurs régulant la croissance (Soto-Suárez *et al.*, 2017). En conditions dépourvues d'azote, ath-miR396b-3p a été davantage sécrété dans la rhizosphère et le sol éloigné des pots plantés avec *A. thaliana*. Ainsi, ce miARN détient des rôles supplémentaires au niveau des interactions avec les microorganismes et a la capacité, selon les résultats, d'inhiber un transporteur ABC chez un membre du genre *Bacillus*.

Il est connu que, sous un régime pauvre en azote, **miR827** d'*A. thaliana* est significativement moins abondant (Liang, He & Yu, 2012; Zhao *et al.*, 2012). Chez *Arabidopsis* miR827 contribue au maintien de

l'homéostasie du phosphore en condition de carence azotée. miR827 favorise l'absorption de P, mais lorsque les conditions sont pauvres en N et riches en P, comme les conditions expérimentales du traitement sans ajout d'azote, afin d'éviter une suraccumulation de P, la plante diminue la production du miR827 (Kant, Peng & Rothstein, 2011). J'ai trouvé ath-miR827 répondant significativement au traitement aux acides aminés dans le sol éloigné d'*A. thaliana*. Tout comme ath-miR158, la réponse du ath-miR827 confirme l'hypothèse générale stipulant que les miARNs inhibant le transport d'acides aminés chez les microorganismes allaient être relâchés hors des racines en présence d'acides aminés.

Les interactions interrègnes du **miR2916** ont déjà été discutées en raison de son abondance dans le plasma d'échantillons humains (Liu *et al.*, 2017b) quoique la méthodologie de cette étude a été critiquée (Witwer, 2018). Puisque le miR2916 est retrouvé dans la base de données miRBase (retrouvé chez *Populus euphratica*) et ne correspond pas à une séquence synthétisée par le génome humain, on peut croire qu'il s'agit d'un miARN de plante. Par ailleurs, miR2916 a été trouvé dans le sérum de souris ayant ingérés du pollen d'abeille de la plante colza (*Brassica campestris* L.) (Chen *et al.*, 2016). Ce miARN est donc probablement transmis de la plante aux mammifères et agit en tant q'ARN interférant (ARNi). peu-miR2916 a répondu significativement au NH_4NO_3 dans les pots plantés avec *B. distachyon* et *A. thaliana*. Les analyses de cibles bactériennes ont révélé que ce miARN cible potentiellement des peptidases et protéases d'une variété de genres bactériens. Étant donné son ubiquité, ce miARN cible possiblement une gamme diversifiée de taxons.

Une étude pertinente a vérifié l'expression différentielle des miARNs au niveau des feuilles et du tissu calleux (tissu se cicatrisant) lors d'un traitement aux lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Djami-Tchatchou & Dubery, 2015). La production du **miR5642** a augmenté d'un facteur de 1.1 trois heures post-inoculation des LPS. Parmi les miARNs répondant significativement à l'azote, la production des miR156, miR159 et miR396 a augmenté dans les tissus calleux lors de l'exposition aux LPS. Au niveau des feuilles, la quantité des miR158 et miR396 a baissé (les miR156 et miR159 n'ont pas été repérés dans les feuilles) alors que l'abondance du miR5642 a augmenté d'un facteur 1.4 trois heures après le traitement aux LPS. Contrairement aux autres miARNs tels que miR158, miR159 et miR396, le miR5642 n'est pas reconnu comme étant un miARN répondant au stress, donc miR5642 répond peut-être à la présence des LPS dans le cadre d'initier une interaction interrègne. Mes résultats ont repéré miR5642 répondant significativement aux acides aminés. Peut-être la production du ath-miR5642b s'est effectué en réponse au changement microbien engendré par la fertilisation aux acides aminés plutôt qu'à la présence des acides aminés tels quels. Par ailleurs, ath-miR5642b peut cibler des réductases de nitrite (NO_2^-) et des

réductases d'oxyde nitreux (N_2O) affectant ainsi la transformation de nitrite en ammonium et celle de l'oxyde nitreux en diazote respectivement.

Le potentiel d'acidification de fertilisants commerciaux est urée-nitrate d'ammonium = nitrate d'ammonium > nitrate de calcium-ammonium > nitrate de calcium (Peryea & Burrows, 1999). Comme de fait, les résultats ont démontré que le fertilisant de nitrate d'ammonium a significativement acidifié le sol. Selon les analyses de corrélations, plusieurs miARNs ont été corrélés significativement au pH. Les miARNs aof-miR166d et peu-miR2916 ont été deux miARNs répondant à la fois aux fertilisants et corrélés significativement au pH. Pour aof-miR166d, dont la présence a été favorisée par l'absence d'azote, son abondance a également eu tendance à être plus élevée lors de pH plus basique. Puisqu'aucune différence significative a caractérisé le pH du sol éloigné traité aux acides aminés et celui traité sans ajout d'azote, il est improbable que le miARN aof-miR166d a été relâché par la plante spécifiquement en réponse aux conditions plus basiques. Pour peu-miR2916, répondant au traitement au NH_4NO_3 il a été attendu que son abondance corrèle négativement avec le pH, mais à la suite de l'analyse graphique cela n'a pas été le constat. En fait, les miARNs identifiés comme peu-miR2916, corrélés significativement au pH, ont appartenu à de clusters d'identification différents de ceux répondant significativement aux fertilisants. Ainsi, le signal environnemental contribuant au relâchement de peu-miR2916 par la plante a été plus complexe qu'anticipé. peu-miR2916, identifié chez *A. thaliana* et *B. distachyon*, a peut-être joué un rôle régulateur plus général dans la modulation du microbiote rhizosphérique.

Comme anticipé, certains miARNs ciblant les transporteurs/perméases d'acides aminés des bactéries ont été secrétés en présence du traitement aux acides aminés. De manière plus surprenante, des miARNs répondant à chaque régime de fertilisation ont été trouvés et leurs cibles potentielles étaient variées. Il faut se méfier d'extrapoler les fonctions des miARNs se produisant au sein de la plante à celles entre la plante et d'autres règnes. En revanche, l'exploration fonctionnelle des miARNs permet de connaître les circonstances environnementales provoquant leur expression. On peut également songer à la possibilité que les miARNs ne sont pas activement relâchés, afin d'interagir avec les microorganismes pour aider la plante à acquérir plus d'azote, mais que ces miARNs constituent des molécules trouvées dans la biomasse végétale en décomposition. Étant donné l'approche contraignante employée pour la prédiction des cibles et les preuves littéraires confirmant la présence de quelques-uns des miARNs chez d'autres règnes, j'é mets l'hypothèse que les miARNs qui ont répondu aux fertilisants peuvent interagir avec les microorganismes et ne sont pas des déchets métaboliques. De plus, si une contamination

racinaire (forte présence de biomasse végétale) était caractéristique de la rhizosphère et du sol éloigné une séparation beaucoup moins nette aurait été visible au sein des ACoPs microbiens et des ACoPs présentant le profil des miARNs.

5.3 Profil général du microbiote

Comme attendu, le type de plantes, les compartiments échantillonnés et les régimes fertilisants ont fortement influencé le microbiote actif du sol. La variable Compartiment a expliqué la plus grande proportion de variation des communautés microbiennes : pour la communauté des micromycètes, le sol éloigné s'est distingué avant tout, tandis que pour la communauté des archées et des bactéries, l'endosphère a été caractérisée comme le compartiment le plus différent. L'influence de la plante sur le microbiote est également bien caractérisée et peut même changer entre différents cultivars de la même espèce (Lei *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2019; Fitzpatrick *et al.*, 2018). La raison pour laquelle les fertilisants ont influencé davantage la structure des archées et des bactéries est possiblement que l'utilisation d'azote des rhizobactéries est fortement liée à leur physiologie/régulation. La diversité métabolique englobant l'utilisation d'azote est supérieure chez la communauté bactérienne (Jacoby, Succurro & Kopriva, 2020). L'application d'acides aminés peut changer la structure microbienne comme une étude portant sur la laitue (*Lactuca sativa*) a pu démontrer (Kalivas *et al.*, 2017). Typiquement, le changement de pH devrait avoir un effet sur la structure du microbiote (surtout bactérienne) (Tan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019; Lammel *et al.*, 2018), mais dans mon expérience le pH n'a pas été une variable explicative significative dans le sol éloigné. En fait, la gamme de pH a varié entre 5.055 et 6.110 alors que le gradient de pH évalué dans les autres études était 2 à 5 fois plus large.

5.4 Corrélations entre les miARNs potentiellement relâchés par les plantes et les taxons microbiens

Contrairement à ma quatrième hypothèse, la majorité des corrélations ont été positives plutôt que négatives. Les seuls taxons qui ont été à la fois prédits comme cibles des miARNs et ont été corrélés négativement à l'abondance de ceux-ci ont été : Actinobacteria (aof-miR166d) et *Methylobacterium* (peu-miR2916). Les discordances entre les deux types d'analyses (psRNAtarget et les corrélations de Spearman) peuvent s'expliquer par l'utilisation d'une base de données bactériennes limitée, par une différence communautaire entre les bactéries trouvées dans cette expérience et celles au sein de la base de données RefSoil, par un manque de précision quantitative des miARNs se trouvant à l'extérieur des

racines ou par une approche critiquable de la méthodologie encadrant les analyses de prédiction de cibles. Effectivement, l'utilisation de l'abondance relative des miARNs peut grandement biaiser les résultats produits par les corrélations. Une quantification plus adéquate par reverse transcription - réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-qPCR) ou *digital droplet PCR* (ddPCR) des miARNs pourrait désembrouiller les disparités observées. Par ailleurs, les analyses se rapportant à la prédiction des cibles bactériennes se sont inspirées des interactions entre les miARNs des plantes et les ARNm de celles-ci, or peut-être les règles émises par Devi et al., 2019 sont plus flexibles lorsqu'il est question de miARNs des plantes et leurs cibles microbiennes. La raison pour laquelle une majorité de corrélations positives a été trouvée peut être attribuée à des effets indirects engendrés par l'action des miARNs. Les taxons opportunistes peuvent bénéficier des effets défavorables que les miARNs exercent sur un taxon occupant la même niche écologique. Par exemple, les phylums ou sous-phylums des taxons microbiens les plus souvent corrélés positivement aux miARNs sont assez répandus dans le sol *Haliangium* (Deltaproteobacteria 2.3%), *Opitutus* (phylum Verrucomicrobia 7%), *Cupriavidus* (Betaproteobacteria 10%), *Sorangium* (Deltaproteobacteria : 2.3%), *Myxococcales* (Deltaproteobacteria 2.3%), Xanthomonadales (Gammaproteobacteria 8.1%), Sphingobacteriales (Sphingobacteriia 4.6%) et Rickettsiales (Alphaproteobacteria 18.8%) (Janssen, 2006). Selon les résultats de prédiction de cibles (psRNATarget), la majorité de ces taxons n'a pas été ciblée par les miARNs. Ainsi, ces taxons généralistes sont peut-être capables de répondre aux changements des activités microbiennes engendrées par les miARNs. En fait, les interactions microbes-microbes, sont fondamentaux dans le façonnement du réseau microbien (Hassani, Durán & Hacquard, 2018), alors une modification post-transcriptionnelle de l'activité d'un taxon par un miARN peut créer des nouvelles opportunités dans le réseau.

Les raisons pour lesquelles très peu de taxons fongiques ont été corrélés aux abondances des miARNs peuvent être expliquées par le fait que 1) cette communauté microbienne constitue un compétiteur moins important dans le cycle de l'azote que la communauté bactérienne en raison de leur ratio C:N élevé et 2) la communauté fongique a résisté davantage aux traitements fertilisants donc la sécrétion des miARNs ciblant les taxons fongiques répondant à l'azote a été un enjeu moins important. Le phénomène inverse s'applique à la communauté bactérienne et soulève la question suivante : puisque le traitement aux acides aminés a causé un changement communautaire des archées et des bactéries, est-ce que les miARNs répondant également à ce traitement ont véritablement réagi à la présence des acides aminés ou ont-ils plutôt réagi à la nouvelle structure microbienne ? L'inhibition de certaines

fonctions écologiques liées au cycle de l'azote par les miARNs n'a probablement pas modifié significativement le réseau microbien hors des racines puisque la plante possède plusieurs autres stratégies pour recruter, stabiliser et modifier les communautés (le *priming* rhizosphérique, les métabolites primaires, les phytohormones, les métabolites secondaires et le mucilage racinaire). L'application de fertilisants a également contribué à changer la structure microbienne hors des racines. Bien que la proportion exacte de l'influence du miRNAbolome exsudé sur le microbiote n'a pas été calculée dans cette étude, les corrélations ont permis d'admettre que l'effet des miARNs sur la communauté microbienne risque d'être plus compliqué à discerner en raison du dynamisme du réseau.

6 CONCLUSION

Cette recherche constitue les premiers avancements explorant la sécrétion des miARNs par les plantes hors des racines afin d'accroître la compétitivité contre le microbiote rhizosphérique pour le gain de ressources azotées. Bien que plusieurs caractéristiques aient été repérées afin de mieux comprendre les facteurs influençant le profil microbien et le profil des miARNs, les données de cette étude n'ont pas été en mesure de caractériser de façon précise les effets des miARNs sur la structure du microbiote. Cette expérience ne peut donc pas servir comme preuve que les miARNs sécrétés hors des racines modifient le fonctionnement des activités métaboliques microbiennes du cycle de l'azote. Néanmoins, trois miARNs trouvés à l'extérieur des racines (miR158b, ath-miR158a-3p et ath-miR827) ont permis de valider l'hypothèse générale stipulant qu'en présence du traitement aux acides aminés la plante relâche des miARNs pouvant inhiber le transport des acides aminés chez les bactéries. Pour compléter cette preuve bioinformatique, des expériences confrontant certaines bactéries avec des miARNs synthétiques pourraient être réalisées sur des plaques colorimétriques mesurant l'activité métabolique. On obtiendrait alors des informations quant à l'utilisation du substrat azoté par les microorganismes en présence et en absence des miARNs. De manière très intéressante des miARNs de plantes, ciblant les gènes microbiens liés au cycle de l'azote, ont répondu à chacun des traitements azotés. Ainsi, l'exsudation de miARNs par les plantes représente possiblement une stratégie permettant à la plante d'acquérir l'azote sous une variété de conditions environnementales. La libération de miARNs dans la rhizosphère, pour moduler les activités microbiennes, pourrait provenir d'années de coévolution et représenter un outil incontournable dans le développement de pratiques agricoles durables. Enfin, étant donné que la majorité des miARNs sécrétés en réponse aux conditions azotées (9/11) sont conservés dans le règne végétal, l'utilisation de miARNs comme moyen de compétition contre les microorganismes rhizosphériques afin d'acquérir l'azote est possiblement un phénomène répandu à travers le règne végétal.

ANNEXE : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

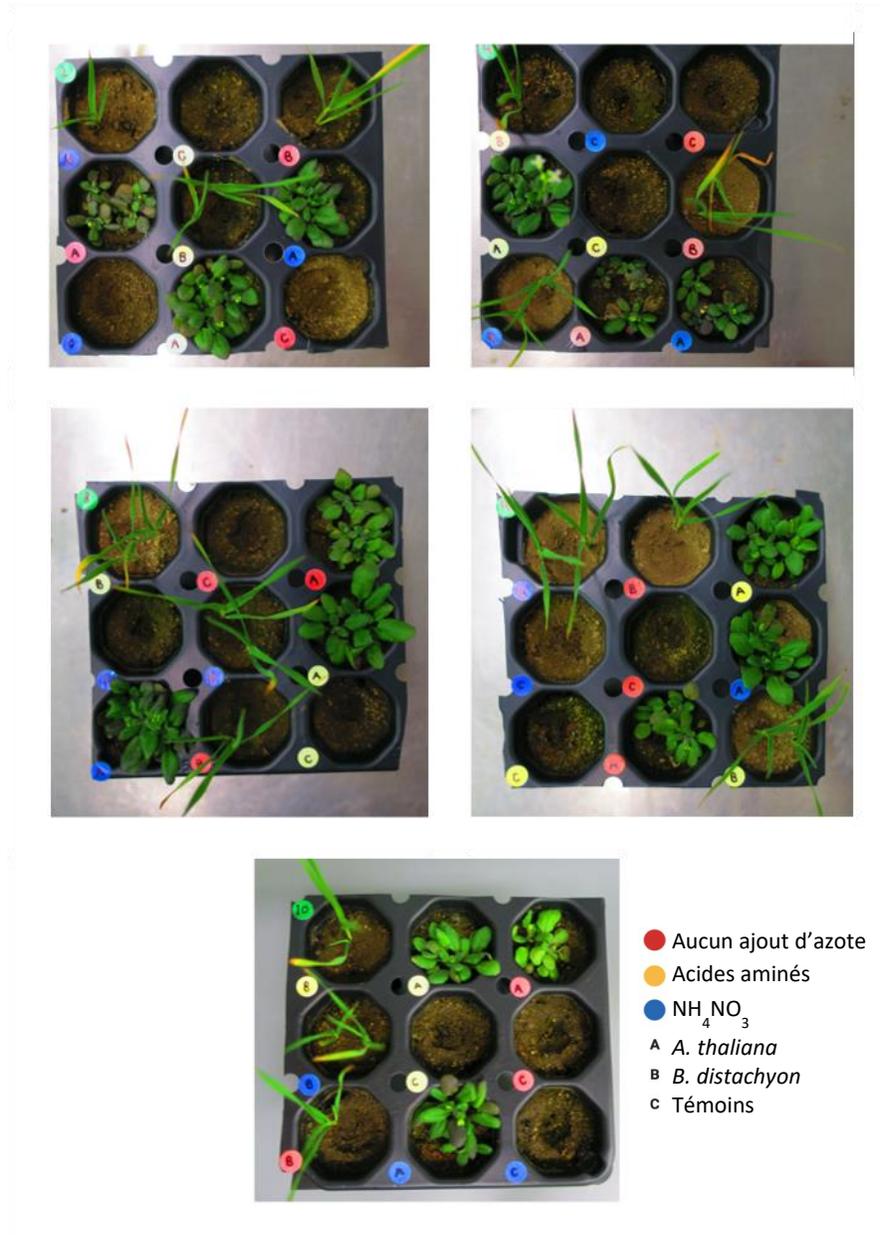


Figure S1.1: Les 5 blocs retenus pour le séquençage des amplicons et des miARNs. De façon générale, les plantes d'*Arabidopsis* sans ajout d'azote ont eu un développement moins prononcé.

Tableau S1.1: Portion du tableau des abondances relatives transformées (Hellinger) des résultats de séquençage des miARNs.

	#872	#871	#869	#867	#866	#864	#863	#862	#860	#859
1	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.05921511	0.00000000	0.00000000	0.05921511	0.00000000	0.04979378	0.06553229
2	0.00000000	0.05209157	0.00000000	0.06194766	0.00000000	0.00000000	0.06194766	0.00000000	0.00000000	0.00000000
3	0.06582188	0.00000000	0.00000000	0.06582188	0.00000000	0.06582188	0.06582188	0.00000000	0.00000000	0.00000000
4	0.00000000	0.04790884	0.00000000	0.04790884	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.04790884	0.00000000	0.00000000
5	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.04884322	0.00000000	0.05808470	0.04884322	0.00000000	0.00000000	0.04884322
6	0.00000000	0.00000000	0.0634838	0.00000000	0.07549538	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.06348380
7	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.07952350	0.07952350	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000
8	0.00000000	0.00000000	0.2869318	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000
9	0.12562993	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.12562993	0.12562993	0.12562993
10	0.11768556	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.15488291	0.00000000	0.11768556

En colonnes se trouvent les identifiants des 10 groupes de miARNs les plus abondants. Un tableau d'identification permet d'associer chaque numéro de groupe au miARN correspondant. En rangées se trouvent 10 échantillons.

Tableau S1.2 : Portion du tableau des abondances relatives transformées (Hellinger) des résultats de séquençage des transcrits du gène ARNr 16S pour la communauté bactérienne.

	ASV#1	ASV#2	ASV#3	ASV#5	ASV#6	ASV#7	ASV#9	ASV#10	ASV#11	ASV#12
1	0.01622451	0.00000000	0.20032147	0.25262587	0.02962177	0.08255215	0.19059489	0.02912389	0.04118741	0.18074947
2	0.65820768	0.08259648	0.04100472	0.04147336	0.21563637	0.06138913	0.03932051	0.04973695	0.09947391	0.02525406
3	0.47507006	0.05987838	0.05967978	0.04724388	0.29819991	0.11531229	0.03928604	0.07533218	0.07872304	0.04466026
4	0.50376313	0.40221497	0.09295810	0.06533652	0.14565351	0.16140937	0.10473623	0.04225115	0.27258769	0.10473623
5	0.00000000	0.47187965	0.07485716	0.10059962	0.03931691	0.12711664	0.13830947	0.00000000	0.22617902	0.15019753
6	0.00000000	0.28271385	0.07230586	0.00000000	0.00000000	0.10341139	0.14972514	0.00000000	0.22480804	0.13201183
7	0.30217932	0.33207454	0.29731040	0.31955353	0.11354993	0.07380395	0.22063197	0.04124025	0.04234019	0.15228287
8	0.03305373	0.23847879	0.30372825	0.26849275	0.03755504	0.05896009	0.23634517	0.00000000	0.00000000	0.24223915
9	0.03408400	0.20775919	0.29183222	0.18971892	0.03797544	0.07488859	0.25201984	0.03771080	0.06933336	0.20606515
10	0.03373936	0.26693304	0.09162582	0.11519040	0.05843829	0.23931768	0.04882017	0.11253480	0.07425534	0.03266799

En colonnes se trouvent les identifiants des 10 ASVs les plus abondants. Un tableau taxonomique permet d'identifier chaque numéro d'ASVs à sa taxonomie. En rangées se trouvent 10 échantillons.

Tableau S1.3: Portion du tableau des abondances relatives transformées (Hellinger) des résultats de séquençage des transcrits de la région ITS2 pour la communauté des micromycètes.

	ASV#1	ASV#2	ASV#3	ASV#5	ASV#6	ASV#7	ASV#9	ASV#10	ASV#11	ASV#12
1	0.96894069	0.07820099	0.03956991	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.01087069	0.04675660
2	0.73928473	0.18859519	0.26762426	0.00000000	0.03507755	0.05186316	0.00000000	0.11360131	0.02071766	0.00000000
3	0.43202064	0.29767594	0.30007982	0.08381535	0.00000000	0.05603542	0.3740519	0.14425304	0.07258622	0.00000000
4	0.84043907	0.04533490	0.07604858	0.12841269	0.01693456	0.16110103	0.00000000	0.07541746	0.04261772	0.00000000
5	0.96705071	0.06827608	0.02930393	0.04953268	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.02215169	0.00000000	0.01278928
6	0.09344467	0.06375266	0.04911638	0.20121302	0.86806680	0.15285206	0.00000000	0.02941639	0.05609486	0.00000000
7	0.96636270	0.06371704	0.08658757	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.01721453	0.00000000	0.00000000
8	0.95224134	0.07382744	0.06489795	0.01740130	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.02032033	0.00000000	0.04633749
9	0.97251587	0.04556988	0.03579546	0.00000000	0.00000000	0.01329410	0.00000000	0.00000000	0.02740649	0.05832763
10	0.31748275	0.39303673	0.31185099	0.16475389	0.00000000	0.09014358	0.00000000	0.12782087	0.13409189	0.00000000

En colonnes se trouvent les identifiants des 10 ASVs les plus abondants. Un tableau taxonomique permet d'identifier chaque numéro d'ASVs à sa taxonomie. En rangées se trouvent 10 échantillons.

Tableau S1.4: Portion du tableau des présence-absence des résultats de séquençage des miARNs.

	#1	#3	#9	#11	#18	#27	#30	#33	#41	#43
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
7	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
8	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En colonnes se trouvent les identifiants de 10 miARNs. Un tableau d'identification permet d'associer chaque numéro de groupe au miARN correspondant. En rangées se trouvent 10 échantillons .

Tableau S1.5: Moyenne du pH du sol éloigné.

Plante	Fertilisants	Bloc	Moyenne du pH
<i>Arabidopsis</i>	Acides aminés	1	6.110
<i>Arabidopsis</i>	NH ₄ NO ₃	1	5.555
<i>Arabidopsis</i>	Aucun ajout	1	5.725
<i>Brachypodium</i>	Acides aminés	1	5.835
<i>Brachypodium</i>	NH ₄ NO ₃	1	5.405
<i>Brachypodium</i>	Aucun ajout	1	5.670
Témoin non-planté	Acides aminés	1	5.375
Témoin non-planté	NH ₄ NO ₃	1	5.360
<i>Arabidopsis</i>	Acides aminés	2	5.740
<i>Arabidopsis</i>	NH ₄ NO ₃	2	5.355
<i>Arabidopsis</i>	Aucun ajout	2	5.525
<i>Brachypodium</i>	Acides aminés	2	5.795
<i>Brachypodium</i>	NH ₄ NO ₃	2	5.265
<i>Brachypodium</i>	Aucun ajout	2	5.520
Témoin non-planté	Acides aminés	2	5.600
Témoin non-planté	NH ₄ NO ₃	2	5.400
Témoin non-planté	Aucun ajout	2	5.655
<i>Arabidopsis</i>	Acides aminés	3	5.490
<i>Arabidopsis</i>	NH ₄ NO ₃	3	5.440
<i>Arabidopsis</i>	Aucun ajout	3	5.460
<i>Brachypodium</i>	Acides aminés	3	5.425
<i>Brachypodium</i>	NH ₄ NO ₃	3	5.180
<i>Brachypodium</i>	Aucun ajout	3	5.605
Témoin non-planté	Acides aminés	3	5.525
Témoin non-planté	Aucun ajout	3	5.395
<i>Arabidopsis</i>	Acides aminés	4	5.695
<i>Arabidopsis</i>	NH ₄ NO ₃	4	5.210
<i>Arabidopsis</i>	Aucun ajout	4	5.740
<i>Brachypodium</i>	Acides aminés	4	5.635
<i>Brachypodium</i>	NH ₄ NO ₃	4	5.240
<i>Brachypodium</i>	Aucun ajout	4	5.520
Témoin non-planté	Acides aminés	4	5.295
Témoin non-planté	NH ₄ NO ₃	4	5.055
Témoin non-planté	Aucun ajout	4	5.315
<i>Arabidopsis</i>	Acides aminés	5	5.660
<i>Arabidopsis</i>	NH ₄ NO ₃	5	5.130
<i>Arabidopsis</i>	Aucun ajout	5	5.800
<i>Brachypodium</i>	Acides aminés	5	5.660
<i>Brachypodium</i>	NH ₄ NO ₃	5	5.300
<i>Brachypodium</i>	Aucun ajout	5	5.710
Témoin non-planté	Acides aminés	5	5.780
Témoin non-planté	NH ₄ NO ₃	5	5.350
Témoin non-planté	Aucun ajout	5	5.470
Témoin CaCl ₂	Témoin CaCl ₂	Témoin CaCl ₂	6.500

Tableau S1.6: miARNs répondant significativement aux fertilisants selon le test H non-paramétrique Kruskal-Wallis et le test Chi-carré d'indépendance

Méthodes	Kruskal-Wallis	Chi-carré
DE NOVO SUB		
Rhizosphère		
Tout	aly-miR161-5p.1 0.04343039 aof-miR166d 0.04741407	ath-miR158b 0.0486064 ath-miR5642b 0.0486064 cas-MR161 0.0486064 aof-miR166d 0.03482936 aof-miR159 0.03445927
<i>A. thaliana</i>	ath-miR158b 0.04343039 ath-miR5642b 0.04343039 aly-miR161-5p.1 0.04343039 aof-miR166d 0.02274108	ath-miR158b 0.0321815 ath-miR5642b 0.0321815 cas-MIR161 0.0321815 aof-miR166d 0.02973128
<i>B. distachyon</i>	n.s.	hpo-mir-50 0.04978707
Endosphère		
Tout	aof-miR398 0.04269648 aly-miR161-5p.1 0.04343039	vvi-MIR845c 0.04415717 aof-MIR827 0.03567399 aly-MIR399a 0.01499558
<i>A. thaliana</i>	bdi-miR159a-3p 0.04343039 aly-miR161-5p.1 0.04176426 cas-MIR166b 0.04357553 ata-miR166c-3p 0.04628871 aof-miR166c 0.02674444 cas-miR167a 0.03209765 bra-miR398-3p 0.04628871 aly-miR399a-5p 0.009032767 aof-miR399a 0.01296225 aof-miR408 0.007718072 cas-miR408 0.01599124 ath-miR827 0.03284808 aof-miR827 0.03364287 ath-MIR5642a 0.0335415	cas-MIR166b 0.03074147 cas-MIR167a 0.01376379 ath-MIR827 0.02024191 aof-MIR827 0.0029283 ath-MIR827 0.03074147
<i>B. distachyon</i>	bdi-miR159b-3p.2 0.01892557 csi-miR160c-5p 0.02059191 bdi-miR171f 0.01374502 ata-miR528-3p 0.02174708 vvi-MIR845c 0.01090405 bdi-miR7757-5p.1 0.032852	aof-MIR398 0.02351775 bdi-MIR444d 0.03567399 vvi-MIR845c 0.02024191
Sol éloigné		
Tout	mle-miR-31-5p 0.04741407	cas-MIR161 0.04415717
<i>A. thaliana</i>	aly-miR161-5p.1 0.0330067 aof-miR166d 0.04269648	cas-MIR161 0.02024191 aof-MIR166d 0.03074147
<i>B. distachyon</i>	mle-miR-31-5p 0.02274108	mle-mir-31 0.02024191

DE NOVO

Rhizosphère	peu-MIR2916 0.03224625 bta-mir-12036 0.01090405	n.s.
Tout		
<i>A. thaliana</i>	aof-miR166d 0.02274108 peu-MIR2916 0.03656563 ath-miR5642b 0.04343039 bta-mir-12036 0.01090405 mmu-mir-6236 0.04343039	aof-MIR166d 0.02973128 peu-MIR2916 0.04978707 ath-MIR5642b 0.0321815 mmu-mir-6236 0.0321815 bta-mir-12036 0.006473748
<i>B. distachyon</i>	n.s.	peu-MIR2916 0.04886226 mmu-mir-6236 0.006473748 hpo-mir-50 0.04978707
Endosphère	aof-miR398 0.04269648 ath-MIR8175 0.04343039 mmu-mir-6236 0.04343039 mmu-mir-6236 0.04343039 mmu-mir-6236 0.0422299	aly-MIR399a 0.01499558 peu-MIR2916 0.01796843 peu-MIR2916 0.03567399 aof-MIR827 0.03567399 ptc-MIR6478 0.02351775 bta-mir-12036 0.03567399 mmu-mir-6236 0.03567399 mmu-mir-6236 0.03567399 mmu-mir-6236 0.03567399 mmu-mir-6236 0.02732372
Tout		
<i>A. thaliana</i>	bdi-miR159a-3p 0.04343039 aly-miR161-5p.1 0.03683051 ata-miR166c-3p 0.04628871 cas-miR166b 0.04357553 aof-miR166c 0.02674444 aof-miR166c 0.04769841 aly-miR399a-5p 0.009032767 aof-miR399a 0.01705301 bra-miR398-3p 0.04628871 cas-miR398b 0.04282759 aof-miR408 0.007718072 cas-miR408 0.01521134 aof-miR827 0.03364287 peu-MIR2916 0.01847701 peu-MIR2916 0.04343039 ath-MIR4228 0.03107261 mmu-mir-6236 0.04208378 mmu-mir-6236 0.03399885 mmu-mir-6236 0.01055212 mmu-mir-6236 0.01055212 mmu-mir-6236 0.02143228 mmu-mir-6236 0.02274108 bta-mir-12036 0.04343039	aof-MIR164 0.03074147 cas-MIR166b 0.03074147 ath-MIR827 0.03074147 aof-MIR827 0.0029283 peu-MIR2916 0.00616242 peu-MIR2916 0.02351775 peu-MIR2916 0.02351775 ath-MIR5642b 0.01376379 bta-miR-2478 0.02024191 bta-miR-12036 0.02351775 bta-miR-12036 0.02351775
<i>B. distachyon</i>	aof-miR159 0.04343039 bdi-miR159b-3p.2 0.02897334 aof-miR166d 0.00.03261611 csi-miR160c-5p 0.02633328 bdi-miR171f 0.009526214 ata-miR528-3p 0.03811971 peu-MIR2916 0.01090405 bdi-miR7757-5p.1 0.032852 ath-MIR8175 0.04343039	aof-MIR398 0.02351775 ata-MIR528 0.03567399 peu-MIR2916 0.00427682 ath-MIR8175 0.02351775
Sol éloigné	mle-mir-31 0.04741407	peu-MIR2916 0.04415717 bmo-mir-3392 0.03567399 mmu-mir-6236 0.03567399 bta-mir-12036 0.01258814
Tout		
<i>A. thaliana</i>	aof-miR166d 0.04269648 mmu-mir-6236 0.04343039 bta-mir-12036 0.01090405	aof-MIR159 0.03074147 aof-MIR166d 0.03074147 peu-MIR2916 0.02351775

<i>B. distachyon</i>	mle-miR-31-5p	0.02274108	mmu-mir-6236	0.02351775
			mmu-mir-6240	0.02351775
			bta-mir-12036	0.00427682
			mle-mir-31	0.02024191

RÉFÉRENCE

Rhizosphère				
<i>A. thaliana</i>	ath-miR158a-3p	0.04279095	ath-miR396b-3p	0.0321815
	ath-miR396b-3p	0.04343039		
<i>B. distachyon</i>	bdi-miR156h-5p	0.04457172	bdi-miR156h-5p	0.04066043
Endosphère				
<i>A. thaliana</i>	ath-miR158b	0.02437658	n.s.	
	ath-miR160a-3p	0.03899022		
	ath-miR164c-5p	0.03579311		
	ath-miR166b-5p	0.01887343		
	ath-miR166d	0.01777433		
	ath-miR390a-3p	0.03178041		
	ath-miR396b-5p	0.01777433		
	ath-miR398b-3p	0.01849971		
	ath-miR398c-3p	0.01133341		
	ath-miR398a-3p	0.01779608		
	ath-miR399c-3p	0.03238694		
	ath-miR399c-5p	0.03178041		
	ath-miR399b	0.003374067		
	ath-miR408-3p	0.007012928		
	ath-miR827	0.02625234		
	ath-miR5642b	0.02423397		
<i>B. distachyon</i>	bdi-miR171f	0.008345386	n.s.	
	bdi-miR399b	0.03178041		
Sol éloigné				
<i>A. thaliana</i>	n.s.		ath-miR827	0.02351775
<i>B. distachyon</i>	n.s.		bdi-miR159b-3--1	0.03567399

n.s : non-significatif.

Tableau S1.7: Séquences des miARNs répondant significativement aux fertilisants.

miARNs	Séquence
bdi-miR156h-5p	ugacagaagagagugagcac
ath-miR158a-3p	ucccaaauguagacaaagca
ath-miR158b	ccccaaauguagacaaagca
aof-miR159	uuuggauugaaggagcucua
bdi-miR159b-3p.1	uuuggauugaaggagcucug
aly-miR161-5p.1	uugaaugacuacaucgggg
aof-miR166d	ucggaccaggcuuauucucc
ath-miR396b-3p	gcucaagaaagcugugggaaa
ath-miR827	uuagaugaccaucaacaacu
peu-miR2916	uggggacucgaagacgaucauau
ath-miR5642b	ucucgcgcuuguacggcuuu

Tableau S1.8: Résultats d'une PERMANOVA effectuée sur les abondances relatives des miARNs pour vérifier si le pH peut expliquer le changement global. Matrice D ~ Fertilisants * Plante * pH (9999 permutations).

Variables explicatives	Méthode <i>De Novo Sub</i>			Méthode <i>De Novo</i>		
	F	R ²	valeur <i>p</i>	F	R ²	valeur <i>p</i>
Fertilisants	1.0864	0.06308	0.3069	1.1827	0.07299	0.0857
Plante	4.0752	0.11831	0.0001 ***	3.4136	0.10534	0.0001 ***
pH	1.0822	0.03142	0.3300	1.1090	0.03422	0.2374
Fertilisants*pH	1.3774	0.07998	0.0386 *	0.9486	0.05854	0.6408

Les autres interactions entre les variables n'étaient pas significatives. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$

Tableau S1.9: Résultats d'une PERMANOVA effectuée sur les abondances relatives des miARNs identifiés par la méthode *Référence* pour vérifier si le pH peut expliquer le changement global. Matrice D ~ Azote * pH (9999 permutations).

Variables explicatives	<i>Arabidopsis</i>			<i>Brachypodium</i>		
	F	R ²	valeur <i>p</i>	F	R ²	valeur <i>p</i>
Fertilisants	0.8053	0.12376	0.8938	1.0458	0.14834	0.3688
pH	0.6532	0.05019	0.9215	1.6510	0.11709	0.1147

Aucune interaction entre les variables n'était significative. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$

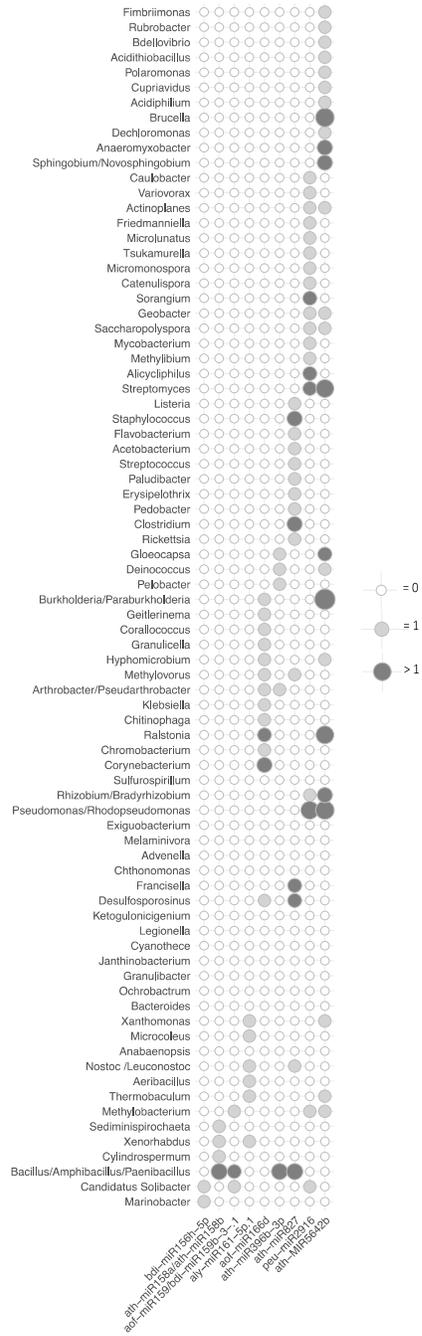


Figure S1.2: Genres bactériens ciblés par les miARNs répondant aux fertilisants et relâchés à l'extérieur des racines. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de fois que le taxon est ciblé.

Tableau S1.10: Résultats des PERMANOVAs effectuées sur les abondances relatives du séquençage d'amplicons (9999 permutations).

PERMANOVAs	Variables contrôlées	Communauté bactérienne et d'archées		Communauté fongique		
		F	valeur p	F	valeur p	
Analyse complète	Fertilisants	0.13735	0.0001 ***	2.2504	0.0028 **	
Matrice D~	Plante	0.12070	0.0001 ***	8.8777	0.0001 ***	
Fertilisants*Plante	Compartiment	0.17233	0.0001 ***	7.3496	0.0001 ***	
*	Fertilisants*Plante	0.03790	0.0029 **	1.3042	0.0658 .	
Compartiment	Fertilisants*Compartiment	0.02987	0.0396 *	0.8932	0.6832	
	Plante*	0.03149	0.0001 ***	1.5453	0.0444 *	
	Compartiment					
Analyse complète	Fertilisants	0.13735	0.0001 ***	1.9921	0.0077 **	
Matrice D~	Plante	0.12070	0.0001 ***	7.8586	0.0001 ***	
Fertilisants*Plante	Fertilisants*Plante	0.03790	0.0769	1.1545	0.1855	
Analyse complète	Fertilisants	0.13735	0.0001 ***	2.1186	0.0055 **	
Matrice D~	Compartiment	0.21086	0.0001 ***	11.8522	0.0001 ***	
Fertilisants*Compartment	Fertilisants*Compartiment	0.03449	0.0585	1.0047	0.4081	
Analyse de chaque Compartiment	Fertilisants	Endosphère	0.14065	0.0003 ***	1.0568	0.2995
Matrice D~		Rhizosphère	5.3513	0.0001 ***	1.4168	0.0077 **
Fertilisants*Plante		Sol éloigné	0.24619	0.0001 ***	1.8627	0.0002 ***
		Endosphère	0.23850	0.0001 ***	1.7157	0.0148 *
	Plante	Rhizosphère	5.8446	0.0001 ***	1.8077	0.0027 **
		Sol éloigné	0.08880	0.0002 ***	2.9678	0.0001 ***
		Endosphère	0.06124	0.1229	0.8922	0.7146
	Fertilisants*Plante	Rhizosphère	1.1682	0.2243	0.8240	0.9670
		Sol éloigné	0.08027	0.0922	0.9618	0.6258
		Endosphère				

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$

Tableau S1.11: Taxons bactériens corrélés aux miARNs répondant significativement aux fertilisants.

	Valeur-p	Rho de Spearman	Taxonomie
De Novo Sub			
Arabidopsis Rhizosphère	ath-miR158b		
	0.0001271442	0.8480265	o__Vampirovibrionales
	0.000294225	0.8235795	g__Haliangium
	0.001920288	0.7520143	g__Cupriavidus
	0.002395472	0.7416472	o__Chthonomonadales
	0.003945734	-0.7163974	g__Niastella
	0.004646325	0.7075251	g__Eoetvoesia
	ath-miR5642b		
	5.386805e-12	0.9914894	g__Azohydromonas
	1.75804e-05	0.8925303	g__Bdellovibrio
	0.0001823819	0.8379907	f__Chitinophagaceae
	0.0001823819	0.8379907	g__Pseudomonas
	0.0002357269	0.8304234	g__Haliangium
	0.000370259	0.8161672	g__Burkholderia-Paraburkholderia
	0.000932228	0.78279	f__Chitinophagaceae
	0.001115687	0.7755586	g__Sorangium
	0.0012768	0.7699511	f__Rickettsiaceae
	0.001392256	0.7662705	g__Labilithrix
	0.001639439	0.7591424	g__Cupriavidus
	0.002238008	0.7448862	f__Chitinophagaceae
	0.002238008	0.7448862	f__Rickettsiaceae
	0.002393266	0.7416914	o__Oligoflexales
	aly-miR161-5p.1		
	3.779245e-05	0.8772079	g__Variibacter
	0.0001271442	0.8480265	g__Hyphomicrobium
	0.0001766806	0.8389019	g__Sorangium
	0.0001823819	0.8379907	g__Haliangium
	0.000370259	0.8161672	o__Rickettsiales
	aof-miR166d		
	1.409084e-06	0.9304148	g__Haliangium
	5.84598e-06	0.9111648	o__Sphingobacteriales
	8.757761e-06	0.9047482	g__Tepidisphaeraceae
0.000370259	0.8161672	g__Litorilinea	
0.000370259	0.8161672	g__Pirellula	
0.0008231459	0.7876548	g__Oligoflexus	
Traitements aux acides aminés	ath-miR158b		
	n.s.		n.s.
	ath-miR5642b		
	0	1	c__Ktedonobacteria
	0	1	f__Acidobacteriaceae
	0	1	g__Asticcacaulis
	aly-miR161-5p.1		
	0	1	g__Opitutus
	0	1	o__Myxococcales
	0	1	g__Duganella
	0	1	c__Gammaproteobacteria
	0	1	f__Sandaracinaceae
	0.00481823	-0.9746794	g__Bdellovibrio
	0.00481823	-0.9746794	o__Myxococcales
	0.00481823	-0.9746794	g__Mesorhizobium

	0.00481823 -0.9746794 0.00481823 -0.9746794 0.00481823 0.9746794 0.00481823 0.9746794 0.00481823 0.9746794 0.00481823 0.9746794	f__Chitinophagaceae g__ <i>Ideonella</i> g__ <i>Rhizomicrobium</i> o__Rhodospirillales o__Myxococcales o__Myxococcales
Traitements sans ajout d'azote	aof-miR166d 0.00481823 -0.9746794 0.00481823 0.9746794 0.00481823 0.9746794	g__ <i>Quadrisphaera</i> p__Chloroflexi f__Xanthobacteraceae
Arabidopsis Sol éloigné	aly-miR161-5p.1 0.001395467 -0.7463019 0.001591407 -0.7405096 0.001683843 0.7379747 0.001751918 -0.7361785 0.002303929 -0.7326741 0.002303929 -0.7233754 0.002851297 -0.7129193	o__Myxococcales g__ <i>Acidibacter</i> g__ <i>Planctomyces</i> o__Myxococcales p__Planctomycetes o__Rhodospirillales o__Halanaerobiales
	aof-miR166d 0.0001064067 0.8352113 0.0002526468 0.8098739 0.002052165 0.728869 0.002378436 0.7218423 0.002543291 -0.7185821 0.002771583 -0.714336 0.002543291 0.7101556	g__ <i>Haliangium</i> f__Archangiaceae g__ <i>Pseudomonas</i> c__Gammaproteobacteria f__Tepidisphaeraceae o__Oligoflexales g__ <i>Variovorax</i>
Traitements au NH ₄ NO ₃	aly-miR161-5p.1 0.04051933 -0.8944272 0.04051933 -0.8944272 0.04051933 -0.8944272 0.04051933 -0.8944272	g__ <i>Coxiella</i> g__ <i>Sphingomonas</i> g__Massilia o__Armatimonadales
Traitements aux acides aminés	aof-miR166d n.s.	n.s.
De Novo		
Arabidopsis Rhizosphère	aof-miR166d 1.409084e-06 0.9304148 5.84598e-06 0.9111648 8.757761e-06 0.9047482 0.000370259 0.8161672 0.000370259 0.8161672 0.0008231459 0.7876548	g__ <i>Haliangium</i> o__Sphingobacteriales f__Tepidisphaeraceae g__ <i>Pirellula</i> g__ <i>Litorilina</i> g__ <i>Oligoflexus</i>
	ath-miR5642b 5.386805e-12 0.9914894 1.75804e-05 0.8925303 0.0001823819 0.8379907 0.0001823819 0.8379907 0.0002357269 0.8304234 0.000370259 0.8161672 0.000932228 0.7827937	g__ <i>Azohydromonas</i> g__ <i>Bdellovibrio</i> g__ <i>Pseudomonas</i> f__Chitinophagaceae g__ <i>Halia</i> g__ <i>Burkholderia-Paraburkholderia</i> f__Chitinophagaceae
	peu-miR2916 0.0004638313 0.8085733 0.002101167 0.747851 0.003283055 0.7260125 0.003393445 0.7243108 0.003878971 0.7173059 0.004134647 0.7138906 0.004501126 -0.7092732	f__Chitinophagaceae g__ <i>Opitutus</i> g__ <i>Nitrosospira</i> p__Verrucomicrobia g__ <i>Caulobacter</i> g__ <i>Nevskia</i> g__ <i>Methylobacterium</i>
Traitement sans	aof-miR166d	

	0.00481823	0.9746794	<i>g__Ohtaekwangia</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Fluviicola</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Rhodospirillales</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Haliangium</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Haliangium</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>c__Alphaproteobacteria</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Rickettsiales</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>f__Chitinophagaceae</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Haliangium</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Phenylobacterium</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Luteimonas</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>o__Rhodospirillales</i>
	peu-miR2916		
	0	1	<i>f__Blastocatellaceae</i>
	0	1	<i>o__Myxococcales</i>
	0	1	<i>p__Acidobacteria</i>
	0	1	<i>g__Flavobacterium</i>
	0	1	<i>f__Nitrosomonadaceae</i>
	0	1	<i>g__Haliangium</i>
	0	1	<i>g__Pedomicrobium</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Oligoflexales</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Sphingobacteriales</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Ktedonobacteriales</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Myxococcales</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>p__Chloroflexi</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>p__Verrucomicrobi</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Dokdonella</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>f__Tepidisphaeraceae</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Halanaerobiales</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>c__Holophaga</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Anaeromyxobacter</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Haliangium</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Zavarzinella</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Variibacter</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Pseudolabrys</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Longilinea</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Devosia</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Devosia</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Bryobacter</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Parafilimonas</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Flavisolibacter</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>f__Tepidisphaeraceae</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Bryobacter</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>f__Oligoflexaceae</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Phenylobacterium</i>
	aof-miR159		
Traitement aux acides aminés	n.s.		n.s.
	ath-miR166d		
	0.00481823	0.9746794	<i>g__Clostridium</i>
	0.00481823	0.9746794	<i>o__Sphingobacteriales</i>
	0.00481823	-0.9746794	<i>g__Haliangium</i>

Référence

<i>Arabidopsis</i>	ath-miR158a		
	0.0005415688	-0.819780	<i>g__Shinella</i>
Rhizosphère	0.0005138282	-0.8050113	<i>o__Myxococcales</i>
	0.0005523893	-0.8024498	<i>g__Dinghuibacter</i>
	0.0009551078	-0.7818324	<i>g__Candidatus Alysiosphaera</i>
	0.001385286	-0.7664857	<i>o__Myxococcales</i>
	0.001614949	-0.7598089	<i>p__Tectomicrobia</i>
	0.03780678	0.7582418	<i>f__Xanthomonadaceae</i>
	0.001724932	0.7568761	<i>c__Gammaproteobacteria</i>
	0.001774474	-0.7556034	<i>g__Pedomicrobium</i>
	0.001888961	0.7527667	<i>o__Vampirovibrionales</i>
	0.001888961	-0.7527667	<i>g__Oligoflexaceae</i>
	0.002058923	-0.7487972	<i>f__Chitinophagaceae</i>

	0.002091095	-0.7480753	<i>g__Bryobacter</i>
	ath-miR396b		
	5.386805e-12	0.9914894	<i>g__Parasegetibacter</i>
	5.386805e-12	0.9914894	<i>f__Chitinophagaceae</i>
	2.087999e-08	0.9659574	<i>g__Novosphingobium</i>
	1.147488e-05	0.9001916	<i>g__Brevundimonas</i>
	1.75804e-05	0.8925303	<i>g__Iamia</i>
	3.779245e-05	0.8772079	<i>g__Rhizobium</i>
	0.0001271442	0.8480265	<i>g__Plantactinospora</i>
	0.0001271442	0.8480265	<i>f__Chitinophagaceae</i>
	0.0001271442	0.8480265	<i>g__Rhodobacter</i>
	0.0001271442	0.8480265	<i>g__Novosphingobium</i>
	0.0001342208	0.8465631	<i>g__Caulobacter</i>
	0.0001823819	0.8379907	<i>f__Streptomyetaceae</i>
	0.0001823819	0.8379907	<i>f__Tepidisphaeraceae</i>
	0.0001823819	0.8379907	<i>g__Rubellimicrobium</i>
	0.000370259	0.8161672	<i>p__Cyanobacteria</i>
Traitement aux acides aminés	ath-miR396b		
	0	1	<i>o__Chlorobiales</i>
	0	1	<i>o__Xanthomonadales</i>
	0	1	<i>g__Novosphingobium</i>
Sol éloigné	ath-miR396b		
	6.355576e-05	0.8485648	<i>f__Acidobacteriaceae</i>
	7.106964e-05	0.8457709	<i>g__Tepidisphaeracea</i>
	0.0001439892	0.8267897	<i>f__Planctomycetaceae</i>
	0.0003482489	0.7994201	<i>g__Candidatus Solibacter</i>
	0.0005215675	0.7853587	<i>g__Azohydromonas</i>
	0.0005215675	0.7853587	<i>g__Gemmata</i>
	0.0005215675	0.7853587	<i>o__Myxococcales</i>
	0.0008242711	0.7680981	<i>p__Proteobacteria</i>
	0.0008242711	0.7680981	<i>p__Omnitrophica</i>
	0.0008242711	0.7680981	<i>g__Bryobacter</i>
	ath-miR827		
	n.s.		n.s.
Référence			
<i>Brachypodium</i>	bdi-miR156h		
	1.75804e-05	0.8925303	<i>o__Xanthomonadales</i>
Rhizosphère	1.75804e-05	0.8925303	<i>g__Variibacter</i>
	3.779245e-05	0.8772079	<i>c__Betaproteobacteria</i>
	3.779245e-05	0.8772079	<i>g__Chungangia</i>
	0.0001337619	0.8466561	<i>g__Psychroglaciecola</i>
	0.0002573522	0.8277483	<i>p__Chloroflexi</i>
	0.0003981363	0.8137569	<i>g__Microlunatus</i>
	0.0004337826	0.8108656	<i>g__Flavisolibacter</i>
	bdi-miR159		
	0.0004569087	0.8090906	<i>g__Bauldia</i>
Traitement sans ajout d'azote	bdi-miR156h		n.s.
	n.s.		
	bdi-miR159-3-.1		
	n.s.		n.s.
Traitement au NH ₄ NO ₃	bdi-miR159-3-.1		
	n.s.		n.s.

Tableau S1.12: Taxons fongiques corrélés aux miARNs répondant significativement aux fertilisants.

	Valeur-p	Rho de Spearman	Taxonomie
De Novo Sub			
<i>Arabidopsis</i>	ath-miR158b		
Rhizosphère	0.0001823819	0.8379907	k__Fungi
	0.001511294	0.7627221	p__Chytridiomycota
	0.003101311	0.728915	g__Blastobotrys
	0.003951268	0.7163226	g__Lobulomyces
	0.004646325	0.7075251	g__Unguiculariopsis
	0.004646325	0.7075251	p__Ascomycota
	ath-miR5642b		
	0.0001271442	0.8480265	g__Paraglomus
	0.0005817228	0.8005959	k__Fungi
	0.000932228	0.7827937	k__Fungi
	0.004646325	0.7075251	g__Unguiculariopsis
	0.004646325	0.7075251	g__Unguiculariopsis
	0.004646325	0.7075251	g__Unguiculariopsis
	aly-miR161-5p.1		
	3.779245e-05	0.8772079	g__Lobulomyces
0.001511294	0.7627221	p__Chytridiomycota	
Traitements aux acides aminés	aof-miR166d		
	0.0009868986	0.7805267	g__Archaeospora
	0.00442027	0.7102659	g__Bipolaris
Traitements sans ajout d'azote	ath-miR158b		
	n.s.		n.s.
	ath-miR5642b		
	n.s.		n.s.
	aly-miR161-5p.1		
	n.s.		n.s.
	aof-miR166d		
	n.s.		n.s.
<i>Arabidopsis</i>	aly-miR161-5p.1		
Sol éloigné	0.003369045	0.7044164	g__Nadsonia.
	aof-miR166d		
	4.779073e-05	0.8554513	g__Mortierella
Traitements au NH ₄ NO ₃	aly-miR161-5p.1		
	0.00481823	-0.9746794	g__Holtermanniella
Traitements aux acides aminés	aof-miR166d		
	0.00481823	-0.9746794	o__Chytridiales
	0.00481823	-0.9746794	k__Fungi
De Novo			
<i>Arabidopsis</i>	aof-miR166d		
Rhizosphère	0.0009868986	0.7805267	g__Archaeospora
	0.00442027	0.7102659	g__Bipolaris
	ath-miR5642b		
	0.001907163	0.8480265	g__Paraglomus

	0.008725842	0.8005959	k__Fungi
	0.01398342	0.7827937	k__Fungi
	0.004646325	0.7075251	g__Unguiculariopsis
	0.004646325	0.7075251	g__Unguiculariopsis
	0.004646325	0.7075251	g__Unguiculariopsis
Traitement au NH ₄ NO ₃	peu-miR2916		
	n.s.		n.s.
Traitement aux sans ajout d'azote	aof-miR166d		
	n.s.		n.s.
Traitement aux acides aminés	ath-miR5642b		
	0	1	k__Fungi
<i>Brachypodium</i> Rhizosphère	peu-miR2916		
	n.s.		n.s.
<i>Arabidopsis</i> Sol éloigné	aof-miR159		
	0.002240428	0.7247138	g__Rhodotorula
	aof-miR166d		
	0.0007168609	0.855451	g__Mortierella
	peu-miR2916		
	9.90508e-05	0.8371406	k__Fungi
	0.0005215675	0.7853587	g__Paludomyces
	0.0008242711	0.7680981	g__Mortierella
	0.001535907	0.742089	g__Clydaea
	0.002663166	0.7163162	g__Paraglomus
Traitement aux sans ajout d'azote	aof-miR166d		
	0.00481823	-0.9746794	o__Chytridiales
	0.00481823	-0.9746794	k__Fungi
	peu-miR2916		
	n.s.		n.s.
Traitement aux acides aminés	aof-miR166d		
	0	1	g__Mortierella
	0	1	g__Archaeospora
	0.00481823	-0.9746794	g__Lobulomyces
	aof-miR159		
	n.s.		n.s.
Référence			
<i>Arabidopsis</i> Rhizosphère	ath-miR396b		
	5.386805e-12	0.9914894	k__Fungi
	0.0001271442	0.8480265	g__Clydaea
	0.0001823819	0.8379907	g__Paludomyces
	0.001511294	0.7627221	g__Triscelophorus
	ath-miR158		
	n.s.		n.s.
Traitement sans ajout d'azote	ath-miR396b		
	n.s.		n.s.
<i>Arabidopsis</i> Sol éloigné	ath-miR396b		
	7.106964e-05	0.8457709	k__Fungi
	0.0008242711	0.7680981	p__Ascomycota
	0.0008242711	0.7680981	k__Fungi
	0.002663166	0.7163162	g__Hemileia
	0.00316178	0.7076859	g__Claroideoglomus

	ath-miR827 n.s.	n.s.
Traitement sans ajout d'azote	ath-miR396b n.s.	n.s.

Référence

<i>Brachypodium</i> Rhizosphère	bdi-miR156h		
	0.001488418	0.7633863	k__Fungi
	0.001824275	0.7543521	k__Fungi
	0.001824275	0.7543521	k__Fungi
	0.001824275	0.7543521	<i>g__Unguiculariopsis</i>
	bdi-miR159 n.s.		n.s.
Traitement sans ajout d'azote	bdi-miR156h n.s.		n.s.
	bdi-miR159 n.s.		n.s.
Traitement NH ₄ NO ₃	bdi-miR159 n.s.		n.s.

n.s : non-significatif

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Lateif, K., Bogusz, D. & Hocher, V. (2012) 'The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria', *Plant Signal Behav*, 7(6), pp. 636-41.
- Aguilar, J. M. M., Ashby, A. M., Richards, A. J. M., Loake, G. J., Watson, M. D. & Shaw, C. H. (1988) 'Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes', *Journal of General Microbiology*, 134, pp. 2741-2746.
- Amicucci, M. J., Galermo, A. G., Guerrero, A., Treves, G., Nandita, E., Kailemia, M. J., Higdon, S. M., Pozzo, T., Labavitch, J. M., Bennett, A. B. & Lebrilla, C. B. (2019) 'Strategy for Structural Elucidation of Polysaccharides: Elucidation of a Maize Mucilage that Harbors Diazotrophic Bacteria', *Anal Chem*, 91(11), pp. 7254-7265.
- An, Q., Ehlers, K., Kogel, K. H., van Bel, A. J. & Hüchelhoven, R. (2006) 'Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus', *New Phytol*, 172(3), pp. 563-76.
- An, Q., van Bel, A. J. & Hüchelhoven, R. (2007) 'Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies?', *Plant Signal Behav*, 2(1), pp. 4-7.
- Anderson, M. J. (2001). 'A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.' *Austral Ecology*, 26, pp. 32-46.
- Anderson, M. J. (2017). 'Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA).' Wiley StatsRef: Statistics Reference Online.
- Anderson, M. J. & Walsh, D. C. I. (2013). 'PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing?.' *Ecological Monographs*, 83, pp.557-574.
- Andrews, M. & Andrews, M. E. (2017) 'Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses', *Int J Mol Sci*, 18(4).
- Arkipova, T. N., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., Kudoyarova, G. R. & Veselov, S. U. (2005) 'Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants', *Plant Soil*, 272, pp. 201–209.
- Ashida, Y., Arashiba, K., Nakajima, K. & Nishibayashi, Y. (2019) 'Molybdenum-catalysed ammonia production with samarium diiodide and alcohols or water', *Nature*, 568(7753), pp. 536-540.
- Axtell, M. J. & Meyers, B. C. (2018) 'Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data', *The Plant Cell*, 30, pp. 272- 284.
- Bago, B., Pfeffer, P. E. & Shachar-Hill, Y. (2000) 'Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas', *Plant Physiol*, 124(3), pp. 949-58.
- Baldrich, P., Rutter, B. D., Karimi, H. Z., Podicheti, R., Meyers, B. C. & Innes, R. W. (2019) 'Plant Extracellular Vesicles Contain Diverse Small RNA Species and Are Enriched in 10- to 17-Nucleotide "Tiny" RNAs', *Plant Cell*, 31(2), pp. 315-324.
- Basirat, M., Mousavi, S. M., Abbaszadeh, S., Ebrahimi, M. & Zarebanadkouki, M. (2019) 'The rhizosphere: a potential root trait helping plants to tolerate drought stress.', *Plant and Soil*, 445, pp. 565–575.
- Battenberg, K., Wren, J. A., Hillman, J., Edwards, J., Huang, L. & Berry, A. M. (2017) 'The Influence of the Host Plant Is the Major Ecological Determinant of the Presence of Nitrogen-Fixing Root Nodule Symbiont Cluster II Frankia Species in Soil', *Appl Environ Microbiol*, 83(1).
- Bender, M., Holben, W. E., Sørensen, S. J. & Jacobsen, C. S. (2007) 'Use of a PNA probe to block DNA-mediated PCR product formation in prokaryotic RT-PCR', *BioTechniques*, 42(5), pp. 609-614

- Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L. M. (2012) 'Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents', *Genet Mol Biol*, 35(4 (suppl)), pp. 1044-51.
- Bengtson, P., Barker, J. & Grayston, S. J. (2012) 'Evidence of a strong coupling between root exudation, C and N availability, and stimulated SOM decomposition caused by rhizosphere priming effects', *Ecol Evol*, 2(8), pp. 1843-52.
- Bengtsson, G., Bengtson, P. & Månsson, K. F. (2003) 'Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity.', *Soil Biology and Biochemistry*, 35(1), pp. 143–154.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J. & Bakker, P. A. H. M. (2012) 'The rhizosphere microbiome and plant health.', *Trends in Plant Science*, 17(8), pp. 478–486.
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., de Jonge, R., Burgman, W. P., Burmølle, M., Herschend, J., Bakker, P. A. H. M. & Pieterse, C. M. J. (2018) 'Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium', *ISME J*, 12(6), pp. 1496-1507.
- Boivin, S., Fonouni-Farde, C. & Frugier, F. (2016) 'How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions', *Front Plant Sci*, 7, pp. 1240.
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014) 'Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114-20.
- Bologna, N. G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplun, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M. & Voinnet, O. (2018) 'Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway', *Mol Cell*, 69(4), pp. 709-719.e5.
- Bonkowski, M. (2004) 'Protozoa & plant growth: the microbial loop in soil revisited', *New Phytol*, 162(3), pp. 617-631.
- Bonkowski, M. B., F. (2002) 'Do soil protozoa enhance plant growth by hormonal effects?', *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), pp. 1709-1715.
- Borcard, D., Gillet, F. & Legendre, P. (2018) 'Numerical ecology with R (2nd ed.)' Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Borcard, D., Legendre, P. & Drapeau, P. (1992) 'Partialling out the Spatial Component of Ecological Variation.' *Ecology*, 73(3), pp.1045-1055.
- Bouwman, A. F., Boumans, M., L. J., Batjes & H., N. (2002) 'Estimation of global NH₃ volatilization loss from synthetic fertilizers and animal manure applied to arable lands and grasslands', *Global Biogeochemical Cycles*, 16(2).
- Boyd, E. S. & Peters, J. W. (2013) 'New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation', *Front Microbiol*, 4, pp. 201.
- Bukovská, P., Bonkowski, M., Konvalinková, T., Beskid, O., Hujšlová, M., Püschel, D., Řezáčová, V., Gutiérrez-Núñez, M. S., Gryndler, M. & Jansa, J. (2018) 'Utilization of organic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi-is there a specific role for protists and ammonia oxidizers?', *Mycorrhiza*, 28(3), pp. 269-283.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J. & Coffey, A. (2017) 'Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases', *Front Microbiol*, 8, pp. 34.
- Butzen, S. (2013) *Common Nitrogen Fertilizers & Stabilizers for Corn Production. Crop Insights*. Available at: https://www.pioneer.com/us/agronomy/common_n_fertilizers_stabilizers.html#Summary_1 (Accessed: 16-10-2020 2020).
- Cai, H., Lu, Y., Xie, W., Zhu, T. & Lian, X. (2012) 'Transcriptome response to nitrogen starvation in rice', *Journal Biosciences*, 37(4), pp. 731-47.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., Holmes, S. P. (2016). 'DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data', *Nat Methods*, 13(7), pp. 581-583.

- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A. & Wanek, W. (2019) 'Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli', *Frontiers in Plant Science*, 10, pp. 157.
- Cao, D., Wang, J., Ju, Z., Liu, Q., Li, S., Tian, H., Fu, D., Zhu, H., Luo, Y. & Zhu, B. (2016) 'Regulations on growth and development in tomato cotyledon, flower and fruit via destruction of miR396 with short tandem target mimic', *Plant Sci*, 247, pp. 1-12.
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N. & Smith, V. H. (1998) 'Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorous and Nitrogen.', *Ecological Applications*, 8, pp. 559-568.
- Chan, S. Y., Liu, S. Y., Seng, Z. & Chua, S. L. (2020) 'Biofilm matrix disrupts nematode motility and predatory behavior', *ISME J*.
- Chapin, F., Moilanen, L. & Kielland, K. (1993) 'Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge.', 361, pp. 153-155.
- Chen, J., Lü, S., Zhang, Z., Zhao, X., Li, X., Ning, P. & Liu, M. (2018a) 'Environmentally friendly fertilizers: A review of materials used and their effects on the environment', *Sci Total Environ*, 613-614, pp. 829-839.
- Chen, J. G., Crooks, R. M., Seefeldt, L. C., Bren, K. L., Bullock, R. M., Darensbourg, M. Y., Holland, P. L., Hoffman, B., Janik, M. J., Jones, A. K., Kanatzidis, M. G., King, P., Lancaster, K. M., Lymar, S. V., Pfromm, P., Schneider, W. F. & Schrock, R. R. (2018b) 'Beyond fossil fuel-driven nitrogen transformations', *Science*, 360(6391).
- Chen, Q., Jiang, T., Liu, Y. X., Liu, H., Zhao, T., Liu, Z., Gan, X., Hallab, A., Wang, X., He, J., Ma, Y., Zhang, F., Jin, T., Schranz, M. E., Wang, Y., Bai, Y. & Wang, G. (2019) 'Recently duplicated sesterterpene (C25) gene clusters in Arabidopsis thaliana modulate root microbiota', *Sci China Life Sci*, 62(7), pp. 947-958.
- Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Jiang, Y., Liu, A., Zhao, P., Wang, M. & Ahammed, G. J. (2017) 'Combined Inoculation with Multiple Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improves Growth, Nutrient Uptake and Photosynthesis in Cucumber Seedlings', *Front Microbiol*, 8, pp. 2516.
- Chen, X., Dai, G. H., Ren, Z. M., Tong, Y. L., Yang, F. & Zhu, Y. Q. (2016) 'Identification of Dietetically Absorbed Rapeseed (Brassica campestris L.) Bee Pollen MicroRNAs in Serum of Mice', *Biomed Res Int*, 2016, pp. 5413849.
- Chávez Montes, R. A., de Fátima Rosas-Cárdenas, F., De Paoli, E., Accerbi, M., Rymarquis, L. A., Mahalingam, G., Marsch-Martínez, N., Meyers, B. C., Green, P. J. & de Folter, S. (2014) 'Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs', *Nat Commun*, 5, pp. 3722.
- Clarholm, M. (1985) 'Interactions of bacteria, protozoa & plants leading to mineralization of soil nitrogen', *Soil Biology and Biochemistry*, 17(2).
- Crews, T. E. (1999) 'The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations.', *Biogeochemistry*, 46, pp. 233-246.
- Cui, C., Wang, J. J., Zhao, J. H., Fang, Y. Y., He, X. F., Guo, H. S. & Duan, C. G. (2020) 'A Brassica miRNA Regulates Plant Growth and Immunity through Distinct Modes of Action', *Mol Plant*, 13(2), pp. 231-245.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N. & Carrington, J. C. (2011) 'Evolution and functional diversification of MIRNA genes', *Plant Cell*, 23(2), pp. 431-42.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H. & Wagner, M. (2015) 'Complete nitrification by Nitrospira bacteria', *Nature*, 528(7583), pp. 504-9.
- Dang, H. & Chen, C. A. (2017) 'Ecological Energetic Perspectives on Responses of Nitrogen-Transforming Chemolithoautotrophic Microbiota to Changes in the Marine Environment', *Front Microbiol*, 8, pp. 1246.

- Davis, K. F., Chhatre, A., Rao, N. D., Singh, D., Ghosh-Jerath, S., Mridul, A., Poblete-Cazenave, M., Pradhan, N. & DeFries, R. (2019) 'Assessing the sustainability of post-Green Revolution cereals in India', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(50), pp. 25034-25041.
- De'ath, G. (2002). 'Multivariate Regression Trees: a new technique for modeling species–environment relationships.' *Ecology*, 83(4), pp.1105–1117.
- Devi, K., Dey, K. K., Singh, S., Mishra, S. K., Modi, M. K. & Sen, P. (2019) 'Identification and validation of plant miRNA from NGS data-an experimental approach', *Brief Funct Genomics*, 18(1), pp. 13-22.
- Dijkstra, F. A., Carrillo, Y., Pendall, E. & Morgan, J. A. (2013) 'Rhizosphere priming: a nutrient perspective', *Front Microbiol*, 4, pp. 216.
- Dixit, S. P., S.K. 'A Review on Nitrification Process', *Advances in Waste Management*, Singapore: Springer, 369-383.
- Djami-Tchatchou, A. T. & Dubery, I. A. (2015) 'Lipopolysaccharide perception leads to dynamic alterations in the microtranscriptome of Arabidopsis thaliana cells and leaf tissues', *BMC Plant Biol*, 15, pp. 79.
- Djordjevic, M. A., Redmond, J. W., Batley, M. & Rolfe, B. G. (1987) 'Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii', *EMBO J*, 6(5), pp. 1173-9.
- Dorff, E. & Beaulieu, M. S. (2014) *Feeding the soil puts food on your plate*. Available at: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/96-325-x/2014001/article/13006-eng.htm#n2> (Accessed: 16-10-2020 2020).
- Druege, U. (2006) 'Ethylene and plant responses to abiotic stress.', in Khan, N.A. (ed.) *Ethylene Action in Plants*. Berlin: Springer-Verlag.
- Dubois, M., Van den Broeck, L. & Inzé, D. (2018) 'The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth', *Trends Plant Sci*, 23(4), pp. 311-323.
- Elsen, A., Gervacio, D., Swennen, R. & De Waele, D. (2008) 'AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in Musa sp.: a systemic effect', *Mycorrhiza*, 18(5), pp. 251-256.
- Erisman, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z. & Winiwarter, W. (2008) 'How a century of ammonia synthesis changed the world.', *Nature Geoscience*, 1(10), pp. 636-639.
- Fang, Y. & Spector, D. L. (2007) 'Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants', *Curr Biol*, 17(9), pp. 818-23.
- Fei, Q., Xia, R. & Meyers, B. C. (2013) 'Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks', *Plant Cell*, 25(7), pp. 2400-15.
- Fernandez-San Millan, A., Farran, I., Larraya, L., Ancin, M., Arregui, L. M. & Veramendi, J. (2020) 'Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development', *Microbiol Res*, 237, pp. 126480.
- Fischer, J. J., Beatty, P. H., Good, A. G. & Muench, D. G. (2013) 'Manipulation of microRNA expression to improve nitrogen use efficiency', *Plant Sci*, 210, pp. 70-81.
- Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M. & Johnson, M. T. J. (2018) 'Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(6), pp. E1157-E1165.
- Forde, B. G. (2014) 'Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update', *Curr Opin Plant Biol*, 21, pp. 30-36.
- Friedl, J., De Rosa, D., Rowlings, D. W., Grace, P. R., Müller, C. & Clemens, S. (2018) 'Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA), not denitrification dominates nitrate reduction in subtropical pasture soils upon rewetting', *Soil Biology & Biochemistry*, 125, pp. 340-349.

- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M. & Yamada, T. (2011) 'Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages', *Appl Environ Microbiol*, 77(12), pp. 4155-62.
- Gai, Z., Zhang, J. & Li, C. (2017) 'Effects of starter nitrogen fertilizer on soybean root activity, leaf photosynthesis and grain yield', *PLoS One*, 12(4), pp. e0174841.
- Galloway, A. F., Knox, P. & Krause, K. (2020) 'Sticky mucilages and exudates of plants: putative microenvironmental design elements with biotechnological value', *New Phytol*, 225(4), pp. 1461-1469.
- Gao, F., Wang, N., Li, H., Liu, J., Fu, C., Xiao, Z., Wei, C., Lu, X., Feng, J. & Zhou, Y. (2016) 'Identification of drought-responsive microRNAs and their targets in *Ammopiptanthus mongolicus* by using high-throughput sequencing', *Sci Rep*, 6, pp. 34601.
- Gao, Z., Karlsson, I., Geisen, S., Kowalchuk, G. & Jousset, A. (2019) 'Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome', *Trends Plant Sci*, 24(2), pp. 165-176.
- Garbaye, J. (1994) 'Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis', *New Phytol*, 128(2), pp. 197-210.
- Garrido, E., Bennett, A. E., Fornoni, J. & Strauss, S. Y. (2010) 'The dark side of the mycorrhiza', *Plant Signal Behav*, 5(8), pp. 1019-21.
- Geisen, S., Rosengarten, J., Koller, R., Mulder, C., Urich, T. & Bonkowski, M. (2015) 'Pack hunting by a common soil amoeba on nematodes', *Environ Microbiol*, 17(11), pp. 4538-46.
- Ghasemi, S., Khoshgofarmanesh, A. H., Afyuni, M. & Hadadzadeh, H. (2013) 'The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulfate to increase yield and grain nutritional quality of wheat', *European Journal of Agronomy*, 45, pp. 68-74.
- Godlewski, M. & Adamczyk, B. (2007) 'The ability of plants to secrete proteases by roots', *Plant Physiol Biochem*, 45(9), pp. 657-64.
- Good, A. G. & Beatty, P. H. (2011) 'Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons', *PLoS Biol*, 9(8), pp. e1001124.
- Gou, J. Y., Felippes, F. F., Liu, C. J., Weigel, D. & Wang, J. W. (2011) 'Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor', *Plant Cell*, 23(4), pp. 1512-22.
- Griffis, T. J., Chen, Z., Baker, J. M., Wood, J. D., Millet, D. B., Lee, X., Venterea, R. T. & Turner, P. A. (2017) 'Nitrous oxide emissions are enhanced in a warmer and wetter world', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(45), pp. 12081-12085.
- Grobelak, A. & Hiller, J. (2017) 'Bacterial siderophores promote plant growth: Screening of catechol and hydroxamate siderophores', *Int J Phytoremediation*, 19(9), pp. 825-833.
- Gu, M., Xu, K., Chen, A., Zhu, Y., Tang, G. & Xu, G. (2010) 'Expression analysis suggests potential roles of microRNAs for phosphate and arbuscular mycorrhizal signaling in *Solanum lycopersicum*', *Physiologia Plantarum*, 138(2), pp. 226-237.
- Gupta, M. M. & Abbott, L. K. (2021) 'Exploring economic assessment of the arbuscular mycorrhizal symbiosis.', *Symbiosis*, 83, pp. 143-152
- Gupta, S. & Pandey, S. (2019) 'ACC Deaminase Producing Bacteria With Multifarious Plant Growth Promoting Traits Alleviates Salinity Stress in French Bean', *Front Microbiol*, 10, pp. 1506.
- Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., Mirza, M. S. & Imran, A. (2021) 'Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability', *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5.
- Hartwig, U. A., Maxwell, C. A., Joseph, C. M. & Phillips, D. A. (1990) 'Effects of alfalfa nod gene-inducing flavonoids on nodABC transcription in *Rhizobium meliloti* strains containing different nodD genes', *J Bacteriol*, 172(5), pp. 2769-73.

- Hassani, M. A., Durán, P. & Hacquard, S. (2018) 'Microbial interactions within the plant holobiont', *Microbiome*, 6(1), pp. 58.
- Haynes, R. J. & Goh, K. M. (1978) 'Ammonium and nitrate nutrition of plants', *Biological Reviews*, 53(4), pp. 465–510.
- He, H., Zhen, Y., Mi, T., Fu, L. & Yu, Z. (2018) 'Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria Differentially Contribute to Ammonia Oxidation in Sediments from Adjacent Waters of Rushan Bay, China', *Front Microbiol*, 9, pp. 116.
- Hignett, T. P. (1985) *The Fertilizer Manual. Developments in plants and soil sciences* Dordrecht: Springer Science & Business Media, p. 35.
- Hill, P. W., Quilliam, R. S., DeLuca, T. H., Farrar, J., Farrell, M., Roberts, P., Newsham, K. K., Hopkins, D. W., Bardgett, R. D. & Jones, D. L. (2011) 'Acquisition and assimilation of nitrogen as peptide-bound and D-enantiomers of amino acids by wheat', *PLoS One*, 6(4), pp. e19220.
- Hill, R. D., Rinker, R. G. & Wilson, H. D. (1980) 'Atmospheric Nitrogen Fixation by Lightning', *Journal of the Atmospheric Sciences*, 37(1), pp. 179–192.
- Holik, L. & Vranová, V. (2019) 'Proteolytic Activity in Meadow Soil after the Application of Phytohormones', *Biomolecules*, 9(9).
- Hu, G., Hao, M., Wang, L., Liu, J., Zhang, Z., Tang, Y., Peng, Q., Yang, Z. & Wu, J. (2020) 'The Cotton miR477- CBP60A Module Participates in Plant Defense Against *Verticillium dahlia*', *Mol Plant Microbe Interact*, 33(4), pp. 624-636.
- Hu, L., Robert, C. A. M., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., Manzo, D., Chervet, N., Steinger, T., van der Heijden, M. G. A., Schlaeppi, K. & Erb, M. (2018) 'Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota', *Nat Commun*, 9(1), pp. 2738.
- Hu, Z., Zhang, H. & Shi, K. (2018) 'Plant peptides in plant defense responses', *Plant Signal Behav*, 13(8), pp. e1475175.
- Huang, A. C., Jiang, T., Liu, Y. X., Bai, Y. C., Reed, J., Qu, B., Goossens, A., Nützmann, H. W., Bai, Y. & Osbourn, A. (2019a) 'A specialized metabolic network selectively modulates', *Science*, 364(6440).
- Huang, C. Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R. & Jin, H. (2019b) 'Small RNAs - Big Players in Plant-Microbe Interactions', *Cell Host Microbe*, 26(2), pp. 173-182.
- Huo, C., Luo, Y. & Cheng, W. (2017) 'Rhizosphere priming effect: A meta-analysis', *Soil Biology and Biochemistry*, 111, pp. 78-84.
- Indicators, W. B. W. D. (2017) *Fertilizer consumption (FAO (2017) & Federico (2008))*. Available at: <https://ourworldindata.org/grapher/fertilizer-application-rates-over-the-long-run?tab=table&time=earliest..2014> (Accessed: 19-10-2020 2020).
- Iwakawa, H. O. & Tomari, Y. (2013) 'Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants', *Mol Cell*, 52(4), pp. 591-601.
- Jacoby, R. P., Succurro, A. & Kopriva, S. (2020) 'Nitrogen Substrate Utilization in Three Rhizosphere Bacterial Strains Investigated Using Proteomics', *Front Microbiol*, 11, pp. 784.
- Jan, M. T., Roberts, P., Tonheim, S. K. & Jones, D. L. (2009) 'Protein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils.', *Soil Biology and Biochemistry*, 41, pp. 2272–2282.
- Janssen, P. H. (2006) 'Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes', *Appl Environ Microbiol*, 72(3), pp. 1719-28.
- Jin, T., Zhang, T. & Yan, Q. (2010) 'Characterization and quantification of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) in a nitrogen-removing reactor using T-RFLP and qPCR', *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(3), pp. 1167-76.
- Joergensen, R. G. (2018) 'Amino sugars as specific indices for fungal & bacterial residues in soil.', *Biology and Fertility of Soils*, 54(5), pp. 559–568.

- Jog, R., Nareshkumar, G. & Rajkumar, S. (2012) 'Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere', *J Appl Microbiol*, 113(5), pp. 1154-64.
- Johnson, N. C., Graham, J.-H. & Smith, F. A. (1997) 'Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum*', *New Phytologist*, 135, pp. 575-585.
- Jones, D. L., Kemmitt, S. J., Wright, D., Cuttle, S. P., Bol, R. & Edwards, A. C. (2005) 'Rapid intrinsic rates of amino acid biodegradation in soils are unaffected by agricultural management strategy.', *Soil Biology and Biochemistry*, 37(7), pp. 1267–1275.
- Jones, D. L. & Kielland, K. (2002) 'Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils', 34(2), pp. 209-219.
- Kachroo, A. & Kachroo, P. (2007) 'Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling', *Genet Eng (N Y)*, 28, pp. 55-83.
- Kalayu, G. (2019) 'Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers', *Journal of Agronomy*.
- Kalivas, A., Ganopoulos, I., Psomopoulos, F., Grigoriadis, I., Xanthopoulou, A., Hatzigiannakis, E., Osathanukul, M., Tsafaris, A. & Madesis, P. (2017) 'Comparative metagenomics reveals alterations in the soil bacterial community driven by N-fertilizer and Amino 16® application in lettuce', *Genom Data*, 14, pp. 14-17.
- Kant, S., Peng, M. & Rothstein, S. J. (2011) 'Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in arabidopsis', *PLoS Genet*, 7(3), pp. e1002021.
- Kearl, J., McNary, C., Lowman, J. S., Mei, C., Aanderud, Z. T., Smith, S. T., West, J., Colton, E., Hamson, M. & Nielsen, B. L. (2019) 'Salt-Tolerant Halophyte Rhizosphere Bacteria Stimulate Growth of Alfalfa in Salty Soil', *Front Microbiol*, 10, pp. 1849.
- Khorassani, R., Hettwer, U., Ratzinger, A., Steingrobe, B., Karlovsky, P. and Claassen, N. (2011) 'Citramalic acid and salicylic acid in sugar beet root exudates solubilize soil phosphorus', *BMC Plant Biol*, 11, pp. 121.
- Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M. & Sakakibara, H. (2011) 'Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin', *J Exp Bot*, 62(4), pp. 1399-409.
- Kihara, J., Nziguheba, G., Zingore, S., Coulibaly, A., Esilaba, A., Kabambe, V., Njoroge, S., Palm, C. & Huising, J. (2016) 'Understanding variability in crop response to fertilizer and amendments in sub-Saharan Africa', *Agric Ecosyst Environ*, 229, pp. 1-12.
- Kitazumi, A., Kawahara, Y., Onda, T. S., De Koeyer, D. & de los Reyes, B. G. (2015) 'Implications of miR166 and miR159 induction to the basal response mechanisms of an andigena potato (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) to salinity stress, predicted from network models in Arabidopsis', *Genome*, 58(1), pp. 13-24.
- Koprivova, A., Schuck, S., Jacoby, R. P., Klinkhammer, I., Welter, B., Leson, L., Martyn, A., Nauen, J., Grabenhorst, N., Mandelkow, J. F., Zuccaro, A., Zeier, J. & Kopriva, S. (2019) 'Root-specific camalexin biosynthesis controls the plant growth-promoting effects of multiple bacterial strains', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(31), pp. 15735-15744.
- Kraft, B., Tegetmeyer, H. E., Sharma, R., Klotz, M. G., Ferdelman, T. G., Hettich, R. L., Geelhoed, J. S. & Strous, M. (2014) 'Nitrogen cycling. The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration', *Science*, 345(6197), pp. 676-9.
- Krishnapriya, V. & Pande, R. (2016) 'Root exudation index: Screening organic acid exudation and phosphorus acquisition efficiency in soybean genotypes', *Crop and Pasture Science*, 67(10).
- Kuenen, J. G. (2008) 'Anammox bacteria: from discovery to application', *Nat Rev Microbiol*, 6(4), pp. 320-6.
- Kumar, H., Bajpai, V. K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. & Kang, S. C. (2010) 'Wilt disease management and enhancement of growth & yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer', *Crop Protection*, 29(6), pp. 591-598.

- Kuzyakov, Y. (2002) 'Factors affecting rhizosphere priming effects.', *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165, pp. 382-396.
- Kuzyakov, Y. & Cheng, W. (2001) 'Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition', 33(14), pp. 1915-1925.
- Lammel, D. R., Barth, G., Ovaskainen, O., Cruz, L. M., Zanatta, J. A., Ryo, M., de Souza, E. M. & Pedrosa, F. O. (2018) 'Direct and indirect effects of a pH gradient bring insights into the mechanisms driving prokaryotic community structures', *Microbiome*, 6(1), pp. 106.
- Larsen, D.R., & Speckman P.L. (2004) 'Multivariate Regression Trees for Analysis of Abundance Data.', *Biometrics*, 60, pp. 543-549.
- Lee, M. W., Huffaker, A., Crippen, D., Robbins, R. T. & Goggin, F. L. (2018) 'Plant elicitor peptides promote plant defences against nematodes in soybean', *Mol Plant Pathol*, 19(4), pp. 858-869.
- Legendre, P. & Legendre, L. (2012) *Numerical ecology. Developments in Environmental Modelling* The Netherlands: Elsevier.
- Lei, S., Xu, X., Cheng, Z., Xiong, J., Ma, R., Zhang, L., Yang, X., Zhu, Y., Zhang, B. & Tian, B. (2019) 'Analysis of the community composition and bacterial diversity of the rhizosphere microbiome across different plant taxa', *Microbiologyopen*, 8(6), pp. e00762.
- Lei, T., Guo, X., Sun, X., Ma, J., Zhang, S. & Zhang, Y. (2018) 'Prediction of soil urea conversion and quantification of the importance degrees of influencing factors through a new combinatorial model based on cluster method and artificial neural network', *Chemosphere*, 199, pp. 676-683.
- Levy-Booth, D. J., Prescott, C. E. & Grayston, S. J. (2014) 'Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems', *Soil Biology and Biochemistry*, 75, pp. 11-25.
- Li, A. L., Wen, Z., Yang, K. & Wen, X. P. (2019a) 'Conserved miR396b-GRF Regulation Is Involved in Abiotic Stress Responses in Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10).
- Li, J., Meng, B., Chai, H., Yang, X., Song, W., Li, S., Lu, A., Zhang, T. & Sun, W. (2019b) 'Arbuscular Mycorrhizal Fungi Alleviate Drought Stress in C', *Front Plant Sci*, 10, pp. 499.
- Li, S.-x., Wang, Z.-h., Miao, Y.-f. & Li, S.-q. (2014) 'Soil Organic Nitrogen and Its Contribution to Crop Production', *Journal of Integrative Agriculture*, 13(10), pp. 2061-2080.
- Li, S. L., L. Jiang, H. Zhang, J. Pan, P. Zhang, S. Guo, J. Zhang, J. Yang, J. (2014) 'It Was Found That Amino Sugar Nitrogen Was a New Source of Energy for Plant', *Journal of Agricultural Science*, 6(2), pp. 45-53.
- Li, X., Bao, H., Wang, Z., Wang, M., Fan, B., Zhu, C. & Chen, Z. (2018) 'Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies in Plant Immunity', *Front Plant Sci*, 9, pp. 979.
- Li, X., Xie, X., Li, J., Cui, Y., Hou, Y., Zhai, L., Wang, X., Fu, Y., Liu, R. & Bian, S. (2017) 'Conservation and diversification of the miR166 family in soybean and potential roles of newly identified miR166s', *BMC Plant Biol*, 17(1), pp. 32.
- Li, Z., Xu, R. & Li, N. (2018) 'Correction to: MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication?', *Nutr Metab (Lond)*, 15, pp. 74.
- Liang, G., He, H. & Yu, D. (2012) 'Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in Arabidopsis thaliana', *PLoS One*, 7(11), pp. e48951.
- Liang, J. & He, J. (2018) 'Protective role of anthocyanins in plants under low nitrogen stress', *Biochem Biophys Res Commun*, 498(4), pp. 946-953.

- Liang, M., Liu, X., Etienne, R. S., Huang, F., Wang, Y. & Yu, S. (2015) 'Arbuscular mycorrhizal fungi counteract the Janzen-Connell effect of soil pathogens', *Ecology*, 96(2), pp. 562-74.
- Liang, W. W., Huang, J. H., Li, C. P., Yang, L. T., Ye, X., Lin, D. & Chen, L. S. (2017) 'MicroRNA-mediated responses to long-term magnesium-deficiency in Citrus sinensis roots revealed by Illumina sequencing', *BMC Genomics*, 18(1), pp. 657.
- Lim, C. W., Baek, W., Jung, J., Kim, J. H. & Lee, S. C. (2015) 'Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses', *Int J Mol Sci*, 16(7), pp. 15251-70.
- Lindström, K. & Mousavi, S. A. (2019) 'Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia', *Microbial Biotechnology*, 13(5).
- Liu, H. & Brettell, L. E. (2019) 'Plant Defense by VOC-Induced Microbial Priming', *Trends Plant Sci*, 24(3), pp. 187-189.
- Liu, S., da Cunha, A., Rezende, R., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L., Gandhi, R. & Weiner, H. (2016) 'The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA.', *Cell Host Microbe*, 19(1), pp. 32-43.
- Liu, W. W., Meng, J., Cui, J. & Luan, Y. S. (2017a) 'Characterization and Function of MicroRNA', *Front Plant Sci*, 8, pp. 2200.
- Liu, Y. C., Chen, W. L., Kung, W. H. & Huang, H. D. (2017b) 'Plant miRNAs found in human circulating system provide evidences of cross kingdom RNAi', *BMC Genomics*, 18(Suppl 2), pp. 112.
- Lu, C. & Tian, H. (2017) 'Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: Shifted hot spots and nutrient imbalance'. *Earth Syst. Sci. Data*, 9, pp. 181–192.
- Lu, Y., Wang, E., Tang, Z., Rui, J., Li, Y., Tang, Z., Dong, W., Liu, X., George, T. S., Song, A. & Fan, F. (2021) 'Roots and microbiome jointly drive the distributions of 17 phytohormones in the plant soil continuum in a phytohormone-specific manner.', *Plant Soil*
- Luvizotto, D. M., Araujo, J. E., Silva, M. C. P., Dias, A. C. F., Kraft, B., Tegetmeyer, H., Strous, M. & Andreote, F. D. (2019) 'The rates and players of denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA) and anaerobic ammonia oxidation (anammox) in mangrove soils', *An Acad Bras Cienc*, 91(suppl 1), pp. e20180373.
- López-Galiano, M. J., García-Robles, I., González-Hernández, A. I., Camañes, G., Vicedo, B., Real, M. D. & Rausell, C. (2019) 'Expression of miR159 Is Altered in Tomato Plants Undergoing Drought Stress', *Plants (Basel)*, 8(7).
- Ma, C. L., Qi, Y. P., Liang, W. W., Yang, L. T., Lu, Y. B., Guo, P., Ye, X. & Chen, L. S. (2016) 'MicroRNA Regulatory Mechanisms on Citrus sinensis leaves to Magnesium-Deficiency', *Front Plant Sci*, 7, pp. 201.
- Ma, W., Muthreich, N., Liao, C., Franz-Wachtel, M., Schütz, W., Zhang, F., Hochholdinger, F. & Li, C. (2010) 'The mucilage proteome of maize (Zea mays L.) primary roots', *J Proteome Res*, 9(6), pp. 2968-76.
- Macholdt, J., Piepho, H.-P. & Honermeier, B. (2019) 'Mineral NPK and manure fertilisation affecting the yield stability of winter wheat: Results from a long-term field experiment', *European Journal of Agronomy*, 102, pp. 14-22.
- Magoč, T. & Salzberg, S. L. (2011) 'FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies', *Bioinformatics*, 27(21), pp. 2957-63.
- Masmoudi, F., Abdelmalek, N., Tounsi, S., Dunlap, C. A. & Trigui, M. (2019) 'Abiotic stress resistance, plant growth promotion and antifungal potential of halotolerant bacteria from a Tunisian solar saltern', *Microbiol Res*, 229, pp. 126331.
- Masson-Boivin, C. & Sachs, J. L. (2018) 'Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story', *Curr Opin Plant Biol*, 44, pp. 7-15.
- Mecchia, M. A., Debernardi, J. M., Rodriguez, R. E., Schommer, C. & Palatnik, J. F. (2013) 'MicroRNA miR396 and RDR6 synergistically regulate leaf development', *Mech Dev*, 130(1), pp. 2-13.
- Meng, Y., Shao, C., Ma, X., Wang, H. & Chen, M. (2012) 'Expression-based functional investigation of the organ-specific microRNAs in Arabidopsis', *PLoS One*, 7(11), pp. e50870.

- Meng, Y., Yu, D., Xue, J., Lu, J., Feng, S., Shen, C. & Wang, H. (2016) 'A transcriptome-wide, organ-specific regulatory map of *Dendrobium officinale*, an important traditional Chinese orchid herb', *Sci Rep*, 6, pp. 18864.
- Middleton, H., Yergeau, É., Monard, C., Combier, J. P. & El Amrani, A. (2021) 'Rhizospheric Plant-Microbe Interactions: miRNAs as a Key Mediator', *Trends Plant Sci*, 26(2), pp. 132-141.
- Millar, A. A., Lohe, A. & Wong, G. (2019) 'Biology and Function of miR159 in Plants.', *Plants (Basel)*, 8(8), pp.255.
- Millar, A. A. & Waterhouse, P. M. (2005) 'Plant and animal microRNAs: similarities and differences', *Funct Integr Genomics*, 5(3), pp. 129-35.
- Miransari, M. (2017) 'Arbuscular Mycorrhizal Fungi & Soil Salinity', in Johnson, N.C., Gehring, C. & Jansa, J. (eds.) *Mycorrhizal Mediation of Soil*: Elsevier, pp. 263-277.
- Miransari, M. & Smith, D. L. (2014) 'Plant hormones and seed germination.', *Environmental and Experimental Botany*, 99, pp. 110-121.
- Mooshammer, M., Wanek, W., Hämmerle, I., Fuchslueger, L., Hofhansl, F., Knoltsch, A., Schnecker, J., Takriti, M., Watzka, M., Wild, B., Keiblinger, K. M., Zechmeister-Boltenstern, S. & Richter, A. (2014) 'Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon:nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling', *Nat Commun*, 5, pp. 3694.
- Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L. & Philippot, L. (2019) 'A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere', *Functional Ecology*, 33, pp. 540-552.
- Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z. B., Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D. & Zhang, H. G. (2014) 'Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles', *Mol Nutr Food Res*, 58(7), pp. 1561-73.
- Mukherjee, A., Verma, J. P., Gaurav, A. K., Chouhan, G. K., Patel, J. S. & Hesham, A. E. (2020) 'Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture', *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(4), pp. 1497-1510.
- Mulvaney, R. L., Khan, S. A. & Ellsworth, T. R. (2009) 'Synthetic Nitrogen Fertilizers Deplete Soil Nitrogen: A Global Dilemma for Sustainable Cereal Production', *Journal of Environmental Quality*, 38, pp. 2295-2314.
- Mur, L. A., Prats, E., Pierre, S., Hall, M. A. & Hebelstrup, K. H. (2013) 'Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways', *Front Plant Sci*, 4, pp. 215.
- NAAS 2009. Crop Response & Nutrient Ratio. *Policy Paper*. New Delhi: National Academy of Agricultural Sciences.
- Nascimento, F. X., Glick, B. R. & Rossi, M. J. (2019) 'Isolation and characterization of novel soil- and plant-associated bacteria with multiple phytohormone-degrading activities using a targeted methodology', *Access Microbiol*, 1(7), pp. e000053.
- Nascimento, F. X., Rossi, M. J. & Glick, B. R. (2018) 'Ethylene and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in Plant-Bacterial Interactions', *Front Plant Sci*, 9, pp. 114.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. & Jones, J. D. (2006) 'A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling', *Science*, 312(5772), pp. 436-9.
- Nazoa, P., Vidmar, J. J., Tranbarger, T. J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., Zhuo, D., Glass, A. D. & Touraine, B. (2003) 'Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage', *Plant Mol Biol*, 52(3), pp. 689-703.
- Nearing, M. A., Pruski, F. F. & O'Neal, M. R. (2004) 'Expected climate change impacts on soil erosion rates: A review', *Journal of Soil and Water Conservation*, 59(1), pp. 43-50.

- Noll, L., Zhang, S. & Waneke, W. (2019) 'Novel high-throughput approach to determine key processes of soil organic nitrogen cycling: Gross protein depolymerization and microbial amino acid uptake', *Soil Biol Biochem*, 130, pp. 73-81.
- Nuccio, E. E., Hodge, A., Pett-Ridge, J., Herman, D. J., Weber, P. K. & Firestone, M. K. (2013) 'An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition', *Environ Microbiol*, 15(6), pp. 1870-81.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. & Babalola, O. O. (2017) 'Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria', *World J Microbiol Biotechnol*, 33(11), pp. 197.
- Olowe, O. M., Olawuyi, O. J., Sobowale, A. A. & Odebode, A. C. (2018) 'Role of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* causing ear rot of *Zea mays* L. (Maize)', *Current Plant Biology*, 15, pp. 30-37.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L. & Caballero-Mellado, J. (2009) 'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants', *Appl Environ Microbiol*, 75(20), pp. 6581-90.
- Osborne, S. L. & Riedell, W. E. (2006) 'Starter Nitrogen Fertilizer Impact on Soybean Yield and Quality in the Northern Great Plains', 98, pp. 1569-1574.
- Ouellette, M.-H., Legendre, P & Borcard, D. (2012) 'Cascade multivariate regression tree: a novel approach for modelling nested explanatory sets.' *Methods in Ecology and Evolution*, 3, pp.234-244.
- Pandey, A., Suter, H., He, J. Z., Hu, H. W. & Chen, D. (2018) 'Nitrogen Addition Decreases Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium in Rice Paddies', *Appl Environ Microbiol*, 84(17).
- Papaspyrou, S., Smith, C. J., Dong, L. F., Whitby, C., Dumbrell, A. J. & Nedwell, D. B. (2014) 'Nitrate reduction functional genes and nitrate reduction potentials persist in deeper estuarine sediments. Why?', *PLoS One*, 9(4), pp. e94111.
- Parizotto, E. A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C. & Voinnet, O. (2004) 'In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA', *Genes Dev*, 18(18), pp. 2237-42.
- Park, M. Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. & Poethig, R. S. (2005) 'Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(10), pp. 3691-6.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R. I., Gamage, H. K., Carroll, B. J., Schenk, P. M. & Schmidt, S. (2008) 'Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(11), pp. 4524-9.
- Peng, B., Kong, H., Li, Y., Wang, L., Zhong, M., Sun, L., Gao, G., Zhang, Q., Luo, L., Wang, G., Xie, W., Chen, J., Yao, W., Peng, Y., Lei, L., Lian, X., Xiao, J., Xu, C., Li, X. & He, Y. (2014) 'OsAAP6 functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice', *Nat Commun*, 5, pp. 4847.
- Peryea, F. J. & Burrows, R. L. (1999) 'Soil acidification caused by four commercial nitrogen fertilizer solutions and subsequent soil pH rebound', *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30(3-4), pp. 525-533.
- Philippot, L., Hallin, S. & Schloter, M. (2007) 'Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil.', *Advances in Agronomy*, pp. 249-305.
- Pingali, P. L. (2012) 'Green revolution: impacts, limits, and the path ahead', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(31), pp. 12302-8.
- Poole, P., Ramachandran, V. & Terpolilli, J. (2018) 'Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts', *Nat Rev Microbiol*, 16(5), pp. 291-303.
- Püschel, D., Janoušková, M., Voříšková, A., Gryndlerová, H., Vosátka, M. & Jansa, J. (2017) 'Arbuscular Mycorrhiza Stimulates Biological Nitrogen Fixation in Two', *Front Plant Sci*, 8, pp. 390.

- Qian, P. & Schoenau, J. J. (2002) 'Availability of nitrogen in solid manure amendments with different C:N ratios', *Canadian Journal of Soil Science*, 82(2), pp. 219-225.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2013) 'The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools', *Nucleic Acids Res*, 41, pp. D590-D596.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. & Bartel, D. P. (2006) 'A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*', *Genes Dev*, 20(24), pp. 3407-25.
- Rao, C. Radhakrishna. (1995) 'A review of canonical coordinates and an alternative to correspondence analysis using Hellinger distance', *Questiú* 19, pp.1-3.
- Read, D. J. & Perez-Moreno, J. (2003) 'Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? ', *New Phytologist*, 157, pp. 475-492.
- Rigamonte, T. A., Pylro, V. S. & Duarte, G. F. (2010) 'The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations', *Braz J Microbiol*, 41(4), pp. 832-40.
- Rillig, M. C., Caldwell, B. A., Wösten, H. A. B. & Sollins, P. (2007) 'Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence.', *Biogeochemistry*, 85(1), pp. 25–44.
- Ripa, F. A., Cao, W. D., Tong, S. & Sun, J. G. (2019) 'Assessment of Plant Growth Promoting and Abiotic Stress Tolerance Properties of Wheat Endophytic Fungi', *Biomed Res Int*, 2019, pp. 6105865.
- Roberts, P. & Jones, D. L. (2012) 'Microbial and plant uptake of free amino sugars in grassland soils', *Soil Biology and Biochemistry*, 49, pp. 139-149.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. (2016) 'VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics', *PeerJ*, 4, pp. e2584.
- Romero-Munar, A., Baraza, E., Gúliás, J. & Cabot, C. (2019) 'Arbuscular Mycorrhizal Fungi Confer Salt Tolerance in Giant Reed ('', *Front Plant Sci*, 10, pp. 843.
- Roy, J. (2008) *Mon engrais vert: un incontournable!* Agriculture Biologique: ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec. Available at: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Regions/chaudiereappalaches/journalvisionagricole/autresarticles/agriculture/Pages/engrais_vert.aspx (Accessed: 16-10-2020 2020).
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R. & Udvardi, M. K. (2020) 'Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation', *Plant Cell*, 32(1), pp. 15-41.
- Rutten, P. J. & Poole, P. S. (2019) 'Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia', *Adv Microb Physiol*, 75, pp. 325-389.
- Rutter, B. D. & Innes, R. W. (2018) 'Extracellular vesicles as key mediators of plant-microbe interactions', *Current Opinion Plant Biology*, 44, pp. 16-22.
- Rütting, T., Huygens, D., Müller, C. & Van Cleemput, O. G., R. Boeckx, P (2008) 'Functional role of DNRA and nitrite reduction in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest.', *Biogeochemistry*, 90, pp. 243-258.
- Sanderson, T. R. (2019) *Nitrogen. Crop Insights*: Britannica. Available at: <https://www.britannica.com/science/nitrogen> (Accessed: 16-10-2020 2020).
- Scheffknecht, S., Mammerler, R., Steinkellner, S. & Vierheilig, H. (2006) 'Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants', *Mycorrhiza*, 16(5), pp. 365-70.

- Schimel, J. P. & Bennett, J. (2004) 'Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm', *Ecology*, 85, pp. 591-602.
- Schulten, H. & Schnitzer, M. (1997) 'The chemistry of soil organic nitrogen: a review.', *Biology Fertility Soils*, 26, pp. 1-15.
- Schulz-Bohm, K., Gerards, S., Hundscheid, M., Melenhorst, J., de Boer, W. & Garbeva, P. (2018) 'Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles', *ISME J*, 12(5), pp. 1252-1262.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. & Weigel, D. (2005) 'Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome', *Dev Cell*, 8(4), pp. 517-27.
- Shah, S., Shrestha, R., Maharjan, S., Selosse, M. A. & Pant, B. (2018) 'Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Fungi from the Roots of', *Plants (Basel)*, 8(1).
- Sharifi, R. & Ryu, C. M. (2018) 'Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future', *Ann Bot*, 122(3), pp. 349-358.
- Shaw, L. J., Nicol, G. W., Smith, Z., Fear, J., Prosser, J. I. & Baggs, E. M. (2006) 'Nitrosospira spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway', *Environ Microbiol*, 8(2), pp. 214-22.
- Simmonds, N. W. (1995) 'The relation between yield and protein in cereal grain.', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(3), pp. 309-315.
- Simpson, A. J., Simpson, M. J., Smith, E. & Kelleher, B. P. (2007) 'Microbially derived inputs to soil organic matter: are current estimates too low?', *Environ Sci Technol*, 41(23), pp. 8070-6.
- Singh, R. (2000) ' Environmental consequences of agricultural development: a case study from the Green Revolution state of Haryana, India.', *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 82(1-3), pp. 97-103.
- Smith, V. H. (2006) 'Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment', *Limnology and Oceanography*, 51(1).
- Sobota, D. J., Compton, J. E., McCrackin, M. L. & Singh, S. (2015) 'Cost of reactive nitrogen release from human activities to the environment in the United States', *Environmental Research Letters*, 10(2).
- Song, Y., Li, J., Liu, M., Meng, Z., Liu, K. & Sui, N. (2019) 'Nitrogen increases drought tolerance in maize seedlings', *Funct Plant Biol*, 46(4), pp. 350-359.
- Soto-Suárez, M., Baldrich, P., Weigel, D., Rubio-Somoza, I. & San Segundo, B. (2017) 'The Arabidopsis miR396 mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens', *Sci Rep*, 7, pp. 44898.
- Spearman, C. (1904) 'The Proof and Measurement of Association between Two Things', *Am. J. Psychol.* 15, pp. 72–101.
- Stewart, W. M., Dibb, D. W., Johnston, A. E. & Smyth, T. J. (2005) 'The Contribution of Commercial Fertilizer Nutrients to Food Production', *Agronomy Journal*, 97, pp. 1-6.
- Stringlis, I. A., de Jonge, R. & Pieterse, C. M. J. (2019) 'The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions', *Plant Cell Physiol*, 60(7), pp. 1405-1419.
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., Berendsen, R. L., Bakker, P. A. H. M., Feussner, I. & Pieterse, C. M. J. (2018) 'MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(22), pp. E5213-E5222.
- Subramanian, S. (2019) 'Little RNAs Go a Long Way: Long-Distance Signaling by MicroRNAs', *Mol Plant*, 12(1), pp. 18-20.
- Sun, R., Li, W., Hu, C. & Liu, B. (2019) 'Long-term urea fertilization alters the composition and increases the abundance of soil ureolytic bacterial communities in an upland soil', *FEMS Microbiol Ecol*, 95(5).

- Szczygieł-Sommer, A. & Gaj, M. D. (2019) 'The miR396-GRF Regulatory Module Controls the Embryogenic Response in Arabidopsis via an Auxin-Related Pathway', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20).
- Tak, H. I., Ahmad, F. & Babalola, O. O. (2013) 'Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals', *Rev Environ Contam Toxicol*, 223, pp. 33-52.
- Talbot, J. M., Bruns, T. D., Smith, D. P., Branco, S., Glassman, S. I., Erlandson, S., Vilgalys, R. & Peay, K. G. (2013) 'Independent roles of ectomycorrhizal and saprotrophic communities in soil organic matter decomposition.', *Soil Biology and Biochemistry*, 57, pp. 282-291.
- Tan, W., Wang, J., Bai, W., Qi, J. & Chen, W. (2020) 'Soil bacterial diversity correlates with precipitation and soil pH in long-term maize cropping systems', *Sci Rep*, 10(1), pp. 6012.
- Tanimoto, T., Hatano, K.-i., Kim, D.-h., Uchiyama, H. & Shoun, H. (1992) 'Co-denitrification by the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*', *FEMS Microbiology Letters*, 93(2), pp. 177–180.
- Tegeder, M. & Rentsch, D. (2010) 'Uptake and partitioning of amino acids and peptides', *Mol Plant*, 3(6), pp. 997-1011.
- Teng, Y., Ren, Y., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Kumar, A., Hutchins, E., Mu, J., Deng, Z., Luo, C., Sundaram, K., Sriwastva, M., Zhang, L., Hsieh, M., Reiman, R., Haribabu, B., Yan, J., Jala, V., Miller, D., Van Keuren-Jensen, K., Merchant, M., McClain, C., Park, J., Egilmez, N. & Zhang, H. (2018a) 'Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota.', *Cell Host Microbe*, 24(5).
- Teng, Y., Ren, Y., Sayed, M., Hu, X., Lei, C., Kumar, A., Hutchins, E., Mu, J., Deng, Z., Luo, C., Sundaram, K., Sriwastva, M. K., Zhang, L., Hsieh, M., Reiman, R., Haribabu, B., Yan, J., Jala, V. R., Miller, D. M., Van Keuren-Jensen, K., Merchant, M. L., McClain, C. J., Park, J. W., Egilmez, N. K. & Zhang, H. G. (2018b) 'Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota', *Cell Host Microbe*, 24(5), pp. 637-652.e8.
- Thirkell, T. J., Cameron, D. D. & Hodge, A. (2016) 'Resolving the 'nitrogen paradox' of arbuscular mycorrhizas: fertilization with organic matter brings considerable benefits for plant nutrition and growth', *Plant Cell Environ*, 39(8), pp. 1683-90.
- Tian, H., Xu, R., Canadell, J. G., Thompson, R. L., Winiwarter, W., Suntharalingam, P., Davidson, E. A., Ciais, P., Jackson, R. B., Janssens-Maenhout, G., Prather, M. J., Regnier, P., Pan, N., Pan, S., Peters, G. P., Shi, H., Tubiello, F. N., Zaehle, S., Zhou, F., Arneth, A., Battaglia, G., Berthet, S., Bopp, L., Bouwman, A. F., Buitenhuis, E. T., Chang, J., Chipperfield, M. P., Dangal, S. R. S., Dlugokencky, E., Elkins, J. W., Eyre, B. D., Fu, B., Hall, B., Ito, A., Joos, F., Krummel, P. B., Landolfi, A., Laruelle, G. G., Lauerwald, R., Li, W., Lienert, S., Maavara, T., MacLeod, M., Millet, D. B., Olin, S., Patra, P. K., Prinn, R. G., Raymond, P. A., Ruiz, D. J., van der Werf, G. R., Vuichard, N., Wang, J., Weiss, R. F., Wells, K. C., Wilson, C., Yang, J. & Yao, Y. (2020) 'A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks', *Nature*, 586(7828), pp. 248-256.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. & Polasky, S. (2002) 'Agricultural sustainability and intensive production practices', *Nature*, 418(6898), pp. 671-7.
- Tremblay, J. & Yergeau, É. (2019) 'Systematic processing of ribosomal RNA gene amplicon sequencing data', *GigaScience*, 8(12).
- Tsai, H. H. & Schmidt, W. (2017) 'Mobilization of Iron by Plant-Borne Coumarins', *Trends Plant Sci*, 22(6), pp. 538-548.
- Turrà, D., El Ghalid, M., Rossi, F. & Di Pietro, A. (2015) 'Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals', *Nature*, 527(7579), pp. 521-4.
- van den Berg, E. M., Rombouts, J. L., Kuenen, J. G., Kleerebezem, R. & van Loosdrecht, M. C. M. (2017) 'Role of nitrite in the competition between denitrification and DNRA in a chemostat enrichment culture', *AMB Express*, 7(1), pp. 91.
- Van Deynze, A., Zamora, P., Delaux, P. M., Heitmann, C., Jayaraman, D., Rajasekar, S., Graham, D., Maeda, J., Gibson, D., Schwartz, K. D., Berry, A. M., Bhatnagar, S., Jospin, G., Darling, A., Jeannotte, R., Lopez, J., Weimer, B. C., Eisen, J. A., Shapiro, H. Y., Ané, J. M. & Bennett, A. B. (2018) 'Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota', *PLoS Biol*, 16(8), pp. e2006352.
- Van Nguyen, T. & Pawlowski, K. (2017) '*Frankia* and Actinorhizal Plants: Symbiotic Nitrogen Fixation', in S., M. (ed.) *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. Microorganisms for Sustainability*. Singapore: Springer.

- Vargas-Asencio, J. A. & Perry, K. L. (2019) 'A Small RNA-Mediated Regulatory Network in Arabidopsis thaliana Demonstrates Connectivity Between phasiRNA Regulatory Modules and Extensive Co-Regulation of Transcription by miRNAs and phasiRNAs', *Front Plant Sci*, 10, pp. 1710.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. & Nasrulhaq Boyce, A. (2016) 'Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review', *Molecules*, 21(5).
- Vilo, C. & Dong, Q. (2012) 'Evaluation of the RDP Classifier Accuracy Using 16S rRNA Gene Variable Regions', *Metagenomics*. 1. 10.4303/mg/235551.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. & Chet, I. (2010) 'Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203', *FEMS Microbiol Lett*, 305(1), pp. 42-8.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D. & Stefani, E. (2018) 'Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes', *Int J Mol Sci*, 19(4).
- Walch-Liu, P., Liu, L. H., Remans, T., Tester, M. & Forde, B. G. (2006) 'Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in Arabidopsis thaliana', *Plant Cell Physiol*, 47(8), pp. 1045-57.
- Wang, C., Zhou, X., Guo, D., Zhao, J., Yan, L., Feng, G., Gao, Q., Yu, H. & Zhao, L. (2019) 'Soil pH is the primary factor driving the distribution and function of microorganisms in farmland soils in northeastern China.', *Annals of microbiology*, 69, pp. 1461–1473.
- Wang, H., Jiao, X., Kong, X., Hamera, S., Wu, Y., Chen, X., Fang, R. & Yan, Y. (2016) 'A Signaling Cascade from miR444 to RDR1 in Rice Antiviral RNA Silencing Pathway', *Plant Physiol*, 170(4), pp. 2365-77.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007) 'Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy', *Appl Environ Microbiol*, 73(16), pp. 5261-7.
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N. & Wang, E. (2017) 'Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis', *Mol Plant*, 10(9), pp. 1147-1158.
- Wang, Z., Xia, Y., Lin, S., Wang, Y., Guo, B., Song, X., Ding, S., Zheng, L., Feng, R., Chen, S., Bao, Y., Sheng, C., Zhang, X., Wu, J., Niu, D., Jin, H. & Zhao, H. (2018) 'Osa-miR164a targets *OsNAC60* and negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*', *Plant Journal*, 95, pp. 584-597.
- Wei, F., Zhao, L., Xu, X., Feng, H., Shi, Y., Deakin, G., Feng, Z. & Zhu, H. (2019) 'Cultivar-Dependent Variation of the Cotton Rhizosphere and Endosphere Microbiome Under Field Conditions', *Front Plant Sci*, 10, pp. 1659.
- Wen, F., White, G. J., VanEtten, H. D., Xiong, Z. & Hawes, M. C. (2009) 'Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection', *Plant Physiol*, 151(2), pp. 820-9.
- Windisch, S., Sommermann, L., Babin, D., Chowdhury, S. P., Grosch, R., Moradtalab, N., Walker, F., Höglinger, B., El-Hasan, A., Armbruster, W., Nesme, J., Sørensen, S. J., Schellenberg, I., Geistlinger, J., Smalla, K., Rothballer, M., Ludwig, U. & Neumann, G. (2020) 'Impact of Long-Term Organic and Mineral Fertilization on Rhizosphere Metabolites, Root-Microbial Interactions and Plant Health of Lettuce', *Front Microbiol*, 11, pp. 597745.
- Witwer, K. W. (2018) 'Alternative miRNAs? Human sequences misidentified as plant miRNAs in plant studies and in human plasma', *F1000Res*, 7, pp. 244.
- Wu, C., Cui, K., Wang, W., Li, Q., Fahad, S., Hu, Q., Huang, J., Nie, L. & Peng, S. (2016) 'Heat-induced phytohormone changes are associated with disrupted early reproductive development and reduced yield in rice', *Sci Rep*, 6, pp. 34978.
- Wu, J., Yang, R., Yang, Z., Yao, S., Zhao, S., Wang, Y., Li, P., Song, X., Jin, L., Zhou, T., Lan, Y., Xie, L., Zhou, X., Chu, C., Qi, Y., Cao, X. & Li, Y. (2017) 'ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice', *Nat Plants*, 3, pp. 16203.

- Xu, R., Tian, H., Pan, S., Prior, S. A., Feng, Y., Batchelor, W. D., Chen, J. & Yang, J. (2019) 'Global ammonia emissions from synthetic nitrogen fertilizer applications in agricultural systems: Empirical and process-based estimates and uncertainty', *Glob Chang Biol*, 25(1), pp. 314-326.
- Yang, D., Kanae, S., Oki, T., Koike, T. & Musiakke, K. (2003) 'Global potential soil erosion with reference to land use and climate changes', *Hydrological Processes*, 17(14), pp. 2913–2928.
- Yao, S., Yang, Z., Yang, R., Huang, Y., Guo, G., Kong, X., Lan, Y., Zhou, T., Wang, H., Wang, W., Cao, X., Wu, J. & Li, Y. (2019) 'Transcriptional Regulation of miR528 by OsSPL9 Orchestrates Antiviral Response in Rice', *Mol Plant*, 12(8), pp. 1114-1122.
- Yi, Y., Li, F., Zhang, M., Yuan, Y., Zhu, M., Guo, W., Zhu, X. & Li, C. (2018) 'Is there a nitrogen fertilizer threshold emitting less N₂O with the prerequisite of high wheat production?', *PLoS One*, 13(8), pp. e0202343.
- Yongbo, L., Xubin, P. & Junsheng, L. A. 2015. 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. *Agronomy for Sustainable Development*. Springer Verlag/EDP Sciences/INRA.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R. & Chen, X. (2005) 'Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis', *Science*, 307(5711), pp. 932-5.
- Yu, Y., Jia, T. & Chen, X. (2017b) 'The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytologist*', *New Phytologist*, 216(4), pp. 1002-1017.
- Yu, Z., Islam, S., She, M., Diepeveen, D., Zhang, Y., Tang, G., Zhang, J., Juhasz, A., Yang, R. & Ma, W. (2018) 'Wheat grain protein accumulation and polymerization mechanisms driven by nitrogen fertilization', *Plant J*, 96(6), pp. 1160-1177.
- Yuan, J., Chaparro, J. M., Manter, D. K., Zhang, R., Vivanco, J. M. & Shen, Q. (2015) 'Roots from distinct plant developmental stages are capable of rapidly selecting their own microbiome without the influence of environmental and soil edaphic factors', *Soil Biology and Biochemistry*, 89, pp. 206-209.
- Yuan, S., Li, Z., Yuan, N., Hu, Q., Zhou, M., Zhao, J., Li, D. & Luo, H. (2020) 'MiR396 is involved in plant response to vernalization and flower development in *Agrostis stolonifera*', *Hortic Res*, 7(1), pp. 173.
- Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. (2006) 'Conservation and divergence of plant microRNA genes', *Plant J*, 46(2), pp. 243-59.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C. M., Allen, R., Melo, I. S. & Paré, P. W. (2007) 'Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*', *Planta*, 226(4), pp. 839-51.
- Zhang, T., Zhao, Y. L., Zhao, J. H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z. Q., Fang, Y. Y., Hua, C. L., Ding, S. W. & Guo, H. S. (2016a) 'Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen', *Nat Plants*, 2(10), pp. 16153.
- Zhang, X., Wang, W., Wang, M., Zhang, H. Y. & Liu, J. H. (2016b) 'The miR396b of *Poncirus trifoliata* Functions in Cold Tolerance by Regulating ACC Oxidase Gene Expression and Modulating Ethylene-Polyamine Homeostasis', *Plant Cell Physiol*, 57(9), pp. 1865-78.
- Zhang, X. D., Sun, J. Y., You, Y. Y., Song, J. B. & Yang, Z. M. (2018) 'Identification of Cd-responsive RNA helicase genes and expression of a putative BnRH 24 mediated by miR158 in canola (*Brassica napus*)', *Ecotoxicol Environ Saf*, 157, pp. 159-168.
- Zhao, J. H. & Guo, H. S. (2019) 'Trans-kingdom RNA interactions drive the evolutionary arms race between hosts and pathogens', *Current Opinion in Genetics Development*, 58-59, pp. 62-69.
- Zhao, M., Tai, H., Sun, S., Zhang, F., Xu, Y. & Li, W. X. (2012) 'Cloning and characterization of maize miRNAs involved in responses to nitrogen deficiency', *PLoS One*, 7(1), pp. e29669.
- Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C., Hu, Y., You, J., Shi, H., Zhu, Y., Gong, Y., Mu, Z., Wang, H., Deng, X., Wang, P., Bressan, R. A. & Zhu, J. K. (2016) 'ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(7), pp. 1949-54.

Zhao, Y., Cong, L. & Lukiw, W. J. (2017) 'Plant and Animal microRNAs (miRNAs) and Their Potential for Inter-kingdom Communication.', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(1), pp. 133-140.

Zhao, Y., Guo, L., Lu, W., Li, X., Chen, H., Guo, C. & Xiao, K. (2015) 'Expression pattern analysis of microRNAs in root tissue of wheat (*Triticum aestivum* L.) under normal nitrogen and low nitrogen conditions.', *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24, pp. 143–153

Zhao, Y., Mo, B. & Chen, X. (2012) 'Mechanisms that impact microRNA stability in plants', *RNA Biol*, 9(10), pp. 1218-23.

Zhu, B., Gutknecht, J. L. M., Herman, D. J., Keck, D. C., Firestone, M. K. & Cheng, W. (2014) 'Rhizosphere priming effects on soil carbon and nitrogen mineralization', *Soil Biology and Biochemistry*, 76, pp. 183-192.

Zuluaga, D. L., De Paola, D., Janni, M., Curci, P. L. & Sonnante, G. (2017) 'Durum wheat miRNAs in response to nitrogen starvation at the grain filling stage', *PLoS One*, 12(8), pp. e0183253.