THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Ecophysiologie et adaptation des plantes

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Portée par
L'UMR PHIM (Plant Health Institute Montpellier)
et
L'UMR CEFE (Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive)

Analyse génétique, physiologique et moléculaire de la modification de sensibilité par le voisinage végétal intra-spécifique

Présentée par Rémi PELISSIER
Le 15 décembre 2021

Sous la direction de Jean-Benoit MOREL
et Cyrille VIOLLE

Devant le jury composé de

M. Jean-Benoit MOREL, Directeur de recherche, INRAE		Directeur de thèse
M. Cyrille VIOLLE, Directeur de recherche, CNRS		Co- Directeur de thèse
M. Philippe REYMOND, Professeur, University of Lausanne		Rapporteur
M. Richard BERTHOME, Directeur de recherche, INRAE		Rapporteur
Mme Hélène FREVILLE, Directrice de recherche, INRAE	Présidente du jury de thèse	Examinatrice
M. Jérôme ENJALBERT, Directeur de recherche, INRAE		Examinateur

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Montpellier SupAgro

« Ce mémoire de thèse rassemble plus d'une centaine d'expériences sur le riz, ce qui représente approximativement plus 1,5 Kilo de graines utilisées dans un but de recherche. Je laisse aux lecteurs le choix de décider si cette thèse présente des résultats assez intéressants ou s'il aurait mieux fallu se servir de ce riz pour préparer par exemple une paëlla pour 20 personnes ! »

Remerciements

Au moment de mettre un terme à ce manuscrit, je réalise en rédigeant la page de couverture, que l'ensemble de ces travaux va être lu dans le but de décider si l'on peut m'attribuer le grade de docteur. Une gratification qui, pour moi, est trop individualiste tant ces 3 années de travail m'ont paru collectives. C'est pour cela que je souhaite mettre en lumière et exprimer ma gratitude envers les personnes qui m'ont accompagné tout au long de mon doctorat.

Tout d'abord, je remercie **Jean Benoit Morel** et **Cyrille Violle**, mes deux encadrants. Non seulement pour m'avoir accordé leur confiance il y a 3 ans, et avoir soutenu ma candidature pour cette thèse, mais aussi pour renouveler cette confiance en me proposant de continuer en tant que post-doctorant mes travaux avec vous. A vos côtés, j'ai non seulement beaucoup appris sur le plan scientifique mais aussi sur le plan humain. Toujours à l'écoute, vous avez su m'accorder le temps nécessaire, alors que vos emplois du temps et responsabilités respectifs ne cessaient de s'épaissir, et pour cela, je vous suis extrêmement reconnaissant.

J'exprime aussi mes remerciements chaleureux à **Elsa Ballini**, et à **Florian Fort** pour m'avoir relu et conseillé, ainsi qu'à **Michel Colombo** pour m'avoir aidé à faire évoluer mes différents résultats vers des versions plus abouties.

Je souhaite également exprimer ma gratitude aux membres de mon comité de thèse qui ont pris de leurs temps pour m'écouter, m'orienter, et m'aider à mieux cerner mes objectifs de recherche : **Delphine Luquet**, **Etienne Pascal Journet**, **Denis Vile** et **Claire Neema**. Je remercie également **Philippe Reymond**, **Richard Berthome**, **Hélène Fréville** ainsi que **Jérôme Enjalbert** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, j'espère que vous apprendrez des choses dans ce manuscrit et que vous prendrez plaisir à le lire.

Comme je l'ai dit, ces 3 années de thèses sont avant tout 3 années de collaboration pour moi, et sans l'appui des différents stagiaires qui m'ont accompagné dans mon aventure : **Cyril**, **Laura**, **Flora** et **Anjara,** je n'aurais jamais pu produire l'ensemble du contenu de ce manuscrit.

En parlant d'aides précieuses, j'adresse mes remerciements sincères à l'ensemble du bâtiment K et plus particulièrement aux membres de l'équipe ICAP, devenu maintenant les équipes CIME et MOMIE. En premier, celle pour qui s'occuper de vos expériences pendant un confinement mondial, ou encore réaliser le travail de 3 personnes à elle seule n'est pas un souci : **Aurélie** ! Merci pour toute ton aide au fil des années. Ensuite à celles sur qui vous pouvez toujours compter pour vous sortir d'un pépin technique: **Isabelle** et **Véronique**, je leur dis

merci. Pour continuer, cette thèse ne contiendrait au final aucun résultat sans l'appui de ce que j'ai nommé « **la dream team du riz** » qui m'ont aidé et fourni de précieux conseils sur la culture du riz : **Loïc**, j'espère que tu profites bien de ta retraite, **Rémy** et **Axel**. Au CEFE, je remercie **Ammar** avec qui j'ai eu plaisir à travailler sur le terrain d'expérimentation. Enfin, toujours pour parler de riz, si vous cherchez un expert en maladie du riz, ou s'il vous faut en urgence un lot de graines, mais surtout, si vous cherchez de la bonne humeur, adressez-vous à **Henry** et son acolyte **Hilaire**, vous ne serez pas déçu et vous repartirez avec plein d'anecdotes.

Lors de cette aventure, j'ai aussi eu la chance de pouvoir goûter à pleins d'autres aspects de la recherche en laboratoire. Pour commencer, un grand merci à l'ensemble de mes collègues chinois de l'université de Kunming pour m'avoir accueilli pendant 2 mois à l'été 2018. Plus particulièrement, parmi eux, je tiens à exprimer ma sympathie et ma reconnaissance à **Huichuan** pour m'avoir introduit au sein de son équipe et m'avoir fait découvrir la chine, ainsi que **Xiang** et **Xiaoping** pour leur bonne humeur et leur invitation à partager la culture chinoise.

En France cette fois ci, je remercie du fond du cœur, **Gérard Loiseau**, professeur de microbiologie à SUPAGRO, pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner à ses côtés. J'ai beaucoup appris avec lui, tant sur les techniques de microbiologie que sur l'encadrement des étudiants. Après son départ en retraite bien mérité, j'ai eu la chance de continuer les travaux pratiques avec **Maeva** et **Ingrid** que je remercie également pour m'avoir reconduit comme vacataire pendant mes 3 années de thèse.

Je dis souvent que la qualité de la situation professionnelle d'une personne se caractérise par 40% de l'intérêt de la tâche à accomplir, et 60% de l'ambiance générale de travail. Si vous voulez mon avis, l'UMR PHIM est un endroit parfait pour remplir ces 60% tant l'ambiance y est bonne. Aussi j'adresse mes remerciements aux anciennes thésardes maintenant devenues docteures qui m'ont accueilli il y a 3 ans : **Edwige**, **Maelle**, **Maude, Emeline** et **Faustine ;** ainsi qu'aux docteurs les plus anciens **Thomas,** amateur de café ultra serré, mon sommeil te remercie ; **Guillaume**, grand joueur de gamecube et toujours prêt à apporter son aide, et **Jérémy**, avec qui, lors de c'est 3 années de thèse, on aura vu l'OM gagner au parc des princes, et ça, cela n'a pas de prix ! J'ai eu la chance d'en côtoyer certains, beaucoup plus longtemps, comme **Marie B, Audrey, Adeline** et **Florian**, toujours de bonne humeur, **Marie L** et **Mélia** toujours partantes pour une bonne blague, ainsi que **Babil, Lucas** et **Mael** toujours prêts à échanger. Je continue en remerciant **Margaux**, **Alexandre** et **Céline** pour être toujours partants pour faire la fête, et **Valentin**, fidèle représentant de l'aile gauche. A vous tous, je dis merci pour les apéros, les volleys à la plage et les parties de ping-pong endiablées. Je finis cette partie

en remerciant l'ensemble des occupants du meilleur bureau de l'unité, le 119. En premier **Yuxuan** et **Luïs** pour leurs précieux conseils, et surtout **Andy** pour nos nombreuses discussions perchées, débats geek, son aide et nos pauses cafés toujours réconfortantes. Enfin je finis par remercier celui sans lequel cette thèse n'aurait pas été aussi loin, **Mathias** qui m'a beaucoup appris et avec qui j'ai eu plaisir à débattre, rigoler et échanger à l'intérieur et en dehors du laboratoire.

Je remercie aussi l'ensemble de ma famille et mes amis, en particulier **mes parents** pour leur soutien à toutes ces différentes étapes tout au long de ma vie et de mes études. Sans eux rien n'aurait été possible.

Enfin, j'adresse mes derniers mots à celle qui m'accompagne et me supporte depuis bientôt 9 ans : **Noémie**. Lorsque je suis à tes côtés, tout me parait plus facile, et cette thèse c'est aussi la tienne en quelque sorte. Je sais que notre aventure ne fait que commencer et que plein de belles choses sont encore à venir.

Table des matières

Remerciements *1*

Table des matières *5*

Table des figures *9*

Liste des abréviations *11*

Introduction générale **13**

I. Contexte général *15*

I.1. Les agents pathogènes, une problématique majeure pour l'agriculture 15

I.1.1. Patho-système riz / *Magnaporthe oryzae* 17

I.1.2. Patho-système blé / *Puccinia triticina* 17

I.2. Difficultés du système agricole actuel à gérer durablement la pression des agents pathogènes 17

II. Quels sont les facteurs qui influencent la résistance des plantes aux agents pathogènes ? *19*

II.1. Les défenses et le système immunitaire des plantes 19

II.1.1. Les défenses passives 19

II.1.2. Les défenses inductibles 19

II.1.2.1. La reconnaissance des agents pathogènes 19

II.1.2.2. Transduction du signal et réponses associées à la reconnaissance 21

II.2. L'environnement module l'immunité des plantes 23

II.2.1. Modification de l'immunité par l'environnement abiotique 24

II.2.2. Modification de l'immunité par l'environnement biotique 27

III. La diversité, un levier prometteur pour l'agriculture *29*

III.1. La diversité au service de la production en agriculture 29

III.2. L'impact de la diversité sur les maladies en agriculture 30

IV. Effets des interactions plantes – plantes sur les maladies des végétaux *31*

IV.1. Mécanismes impliquant la propagation de l'agent pathogène 31

IV.1.1. Barrières physiques à la dispersion et reproduction des agents pathogènes par les plantes voisines 31

IV.1.2. Barrières chimiques produites par les plantes voisines 33

IV.1.3. Induction des défenses ou « priming » par les agents pathogènes des plantes voisines 33

IV.2. Modification de sensibilité par les interactions plantes – plantes en l'absence d'épidémie. 34

Article de revue: Plant immunity: Good fences make good neighbors? 35

IV.3. Résultats préliminaires 44

V. Objectifs de la thèse *47*

V.1. Question centrale du projet et modèles biologiques 47

V.2. Questions spécifiques, hypothèses et démarches effectuées 47

Chapitre 1 : Plant-plant interactions are critical to pathogen resistance in cereal mixtures **51**

I. Présentation générale *52*

II. Article de recherche: Plant-plant interactions are critical to pathogen susceptibility in cereal mixtures *53*
Author affiliations and institutions address**:** 53
Abstract 54
Introduction 55
Results 57
Discussion 62
Methods 64
Reference 67
Supplementary information 71

Chapitre 1 Résultats complémentaires : Le phénotype NMS est-il dépendant du mode de vie de l'agent pathogène concerné ? 75

I. Objectif et présentation de l'étude complémentaire 76

II. Résultats 79

III. Discussions 80

Chapitre 2 : Plant neighbour modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures 85

I. Présentation générale 86

II. Article de recherche: Plant neighbour-modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures 87
Supplementary informations 98

Chapitre 2 Résultats complémentaires : Le voisinage intra-spécifique impacte t'il l'écophysiolgie de la plante focale ? 107

I. Objectif et présentation de l'étude complémentaire. 108

II. Résultats et discussion 111
II.1. Modifications biochimiques de Kitaake en présence de plantes voisines 111
II.2. Le voisinage n'a pas d'impact sur le développement et l'anatomie aérienne de la plantule 115

Chapitre 3 : Plant neighbours trigger genetically controlled changes of susceptibility and well-defined transcriptional changes in their plant neighbourhood 119

I. Présentation générale 120

II. Article de recherche: Plant neighbours trigger genetically-controlled changes of susceptibility and well-defined transcriptional changes in their plant neighbourhood 121
Author affiliations 121
Abstract 122
Introduction 123
Materials and methods 125
Results 131
Discussion 136
References 139
Supplementary figures 144
Supplementary tables 148

Discussion générale **151**

I. Rappel des objectifs et principaux résultats *152*

II. Quels sont les mécanismes pouvant être à l'origine de la NMS dans les mélanges variétaux? *155*

II.1. Les plantes voisines sont-elles perçues comme des perturbateurs biotiques ?... 157

II.1.1. La NMS est-elle un sous effet de la reconnaissance de son voisinage ?..... 158

II.1.2. La NMS, un résultat de l'action directe de molécules ?..... 159

II.1.2.1. Quelles molécules pour déclencher la NMS chez le riz et le blé ? 161

II.1.2.1.1. Molécules susceptible de déclencher la NMS chez le riz 161

II.1.2.1.2. Molécules susceptibles de déclencher la NMS chez le blé..... 162

II.2. Les plantes voisines sont-elles perçues comme perturbateurs abiotiques ? 165

II.2.1. La NMS est-elle déclenchée par une différence d'aptitude à la compétition?165

II.2.2. La NMS est-elle dépendante de l'exploitation de différentes niches écologiques? 166

II.3. Perspectives de recherches 167

II.3.1. Recherche des mécanismes déclencheurs de la NMS 167

II.3.1.1. Caractériser l'ensemble des déclencheurs de la NMS 167

II.3.1.2. Evaluer l'importance du facteur génétique dans le déclenchement de la NMS 168

II.3.2. Recherche des réponses associées à la NMS..... 169

II.3.2.1. Evaluer l'ensemble des réponses associés à la NMS dans la plante focale 169

II.3.2.2. Des mesures physiologiques complémentaires nécessaires 171

II.3.2.3. Etudier la diversité des réponses NMS 171

III. Comment expliquer que les plantes modifient la sensibilité de leurs voisines?..... *173*

III.1. La NMS traduit-elle des capacités différentes des génotypes à gérer les stress de leur environnement ? 173

III.2. La NMS une adaptation sociale des plantes à leurs voisines ? 174

III.2.1. Une régulation de l'immunité individuelle en fonction de la communauté175

III.2.2. L'impact de la sélection de parentèle dans les populations visqueuses 177

III.2.3. Les mécanismes de reconnaissance et leur impact sur les phénomènes de NMS 177

IV. La NMS est-elle une opportunité pour l'agriculture de demain ? *178*

IV.1. Freins techniques et économiques à l'utilisation de la diversité génétique en agriculture..... 179

IV.2. Opportunité et perspectives de recherche pour l'introduction de la NMS dans les programme de sélection 180

IV.2.1. Bien choisir la diversité génétique en amont pour effectuer les premiers tests 181

IV.2.2. Mesurer le pour et le contre des interactions plante-plante sur la santé globale des cultures 181

IV.2.3. Observer et contrôler les conséquences à long terme de l'introduction de la NMS. 182

Conclusion générale..... **183**

Bibliographie..... **185**

Annexes **211**

Annexe.1 Protocole d'extraction et de dosage des acides aminés. 211
Annexe.2 Tableaux supplémentaires chapitre 3. 215

Table des figures

Figure 1. Principales maladies affectant la culture du riz 16
Figure 2. Principales maladies affectant la culture du blé 16
Figure 3. Schématisation du système immunitaire en Zig-Zag des plantes 20
Figure 4. Modèle simplifié du système immunitaire des plantes 22
Figure 5. Triangle de la maladie 23
Figure 6. Modulation de l'immunité des plantes par les micro-organismes non pathogènes (MMI). 26
Figure 7. Distribution des augmentations de rendement analysés dans l'étude de Borg et al. 2018 28
Figure 8. Processus épidémiologiques agissant en condition naturelle et pouvant expliquer la réduction de pression des agents pathogènes en système diversifié 32
Figure 9. Résultats préliminaires montrant une modification de la sensibilité de la variété Nipponbare à *M. oryzae* en fonction de son voisinage végétal 44
Figure 10. Exemple de symptômes provoqués par *Bipolaris oryzae* sur feuilles de riz 77
Figure 11. Résultat des expériences d'inoculations des matrices de mélanges de riz avec le pathogène *Bipolaris oryzae.* 78
Figure 12. Corrélation entre les ratios de sensibilité à *M. oryzae* et *a B. oryzae* dans les deux populations de riz testées 82
Figure 13. Heatmap des variations de concentrations en acides aminés chez la variété Kitaake en présence de différents voisins intra-spécifiques, avant inoculation. 110
Figure 14. Heatmap des variations de concentration en acides aminés chez la variété Kitaake en présence de différents voisins intra-spécifiques, après inoculation. 112
Figure 15. Mesures développementales et anatomiques chez la variété Kitaake en présence de voisins intra-spécifiques 114
Figure 16. Distribution du RST dans une population de blés cultivés inoculés avec l'agent pathogène de la septoriose *Z. tritici* 154
Figure 17. Le voisin végétal: la combinaison d'un stress biotique et abiotique 156
Figure 18. Mécanismes biotiques pouvant être à l'origine de la NMS 160
Figure 19. Mécanismes abiotiques possiblement à l'origine de la NMS 164
Figure 20. Déclenchement et réponses associées à la NMS : questions restantes 170
Figure 21. Hypothèse du compromis entre croissance et défense 172
Figure 22. Théories sociales pouvant expliquer l'apparition de la NMS 176
Figure 23. Intérêt scientifique et agronomique pour les mélanges variétaux 179

Liste des abréviations

AA: Acide Aminé
ABA: Acide Abscissique
ACP: Analyses en Composantes Principales
Avr: Avirulence
B .oryzae : *Bipolaris oryzae*
BR: Brassinostéroïdes
CDPK: Calcium-Dependent Protein Kinases
CERK: Chitin elicitor receptor kinase
CK: Cytokinine
COVs : Composés Organiques Volatiles
DIMBOA: 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one
DIS: Drought-Induced Susceptibility
DMC : Direct Microbial Competition
ETI: Effector-Triggered Immunity
ET: Ethylène
ETS: Effector-Triggered Susceptibility
GA: Gibbéréline
GABA: Gamma-aminobutanoic acid
Gln: Glutamine
Glu: Glutamate
GOGAT: Glutamine 2-Oxaloglutamate Amino Transférase
GWAS: Genome Wide Association
HR: Réaction Hypersensible
IAA: Indole-3-acetic acid
JA: Acide Jasmonique
K: Potassium
M .oryzae : *Magnaporthe oryzae (Pyricularia oryzae)*
MAMP:Microbes-Associated-Molecular Pattern
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MBOA: 6-methoxy-2-benzoxazolinone
MMI : Microbiota Modulated Immunity
N: Azote
N*B-LRR:* Nucleotide-binding site-leucine-rich repeat
NIS: Nitrogen Induced Susceptibility
NLR: Nucleotide-Binding Site Leucine Rich Repeat
NMS : Neighbor Modulated Susceptibility
NO: Oxyde Nitrique
P. triticina *: Puccina triticina*
P: Phosphore
PAL : Phenylalanine ammonia-lyase
PAMP: Pathogen Molecular Patterns
POD : Peroxydase
PR : Pathogenesis Related
PRR: Pattern Recognition Receptors
PTI: PAMP-Triggered Immunity
QTL: Quantitative trait loci
R: Résistance
RLK: Receptor Like Kinase
RNS: Reactive nitrogen species
ROS: Reactive oxygen species
S: Soufre
SA: Acide Salicylique
X.oryzae : *Xanthomonasoryzae*

Z. tritici : *Zymoseptoria tritici*

Introduction générale

I. Contexte général

I.1. Les agents pathogènes, une problématique majeure pour l'agriculture

Dans leur environnement, les plantes sont constamment exposées à des stress biotiques (parasites et pathogènes) et abiotiques (déficit hydrique, changement de température etc…). Ces facteurs affectent leur santé à différentes échelles et intensités (Mertens *et al*., 2021). Aussi, au cours de leur évolution, les plantes ont développé de multiples mécanismes pour maintenir leur fonctionnement en conditions de stress. Certains de ces mécanismes impliquent des réponses morphologiques ou physiologiques qui vont nécessiter des changements moléculaires (Arbona *et al*., 2017). La reconnaissance des facteurs qui déterminent leurs réponses aux différents stress ou à leur combinaison est particulièrement importante pour l'agriculture afin de développer des stratégies pour aider les plantes à tolérer, résister ou à s'adapter (Shameer *et al.*, 2019).

Selon de récents rapports de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation, http://www.fao.org/, 2019) les stress biotiques tels que les bactéries, les virus, les champignons pathogènes, les plantes parasites ainsi que les ravageurs et les adventices sont la cause principale des pertes de rendement en agriculture. Ils représentent de 31 à 42% des pertes en agriculture notamment en rendant les récoltes impossibles ou en provoquant des chutes des rendements. Parmi ces stress biotiques, les agents pathogènes sont une des sources principales des chutes de rendements (Savary *et al.*, 2019).

Les plantes cultivées, et notamment les grandes cultures céréalières (riz, maïs, blé) sont particulièrement exposées à la pression des agents pathogènes. Les champs consistent souvent en une addition de plantes de même génotype cultivés à forte densité ce qui facilite la reproduction et la dispersion des agents pathogènes (Burdon *et al*., 2014). D'autre part, le passage d'une agriculture à petite échelle, diversifiée et à cycle unique (généralement associée à l'agriculture traditionnelle) à une production à grande échelle, génétiquement uniforme et intensive en culture pure (associée à certains systèmes agricoles actuels) a été considéré comme une perturbation des processus de coévolution entre hôte et agents pathogènes, qui favorise

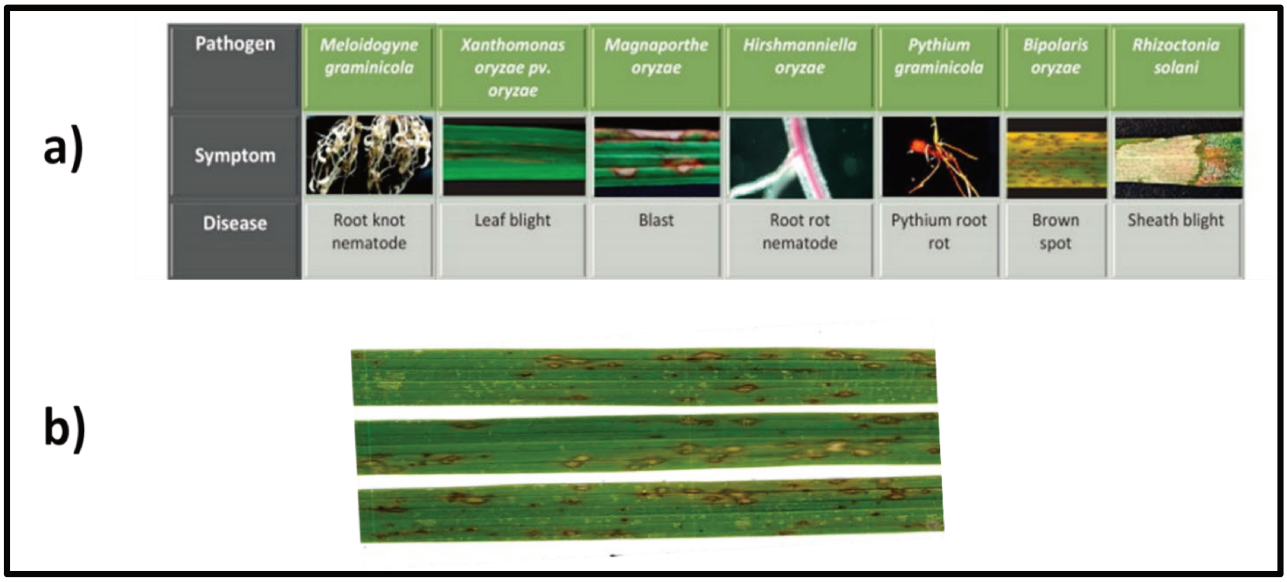


Figure 1. Principales maladies affectant la culture du riz

a) Diversité des principaux agents pathogènes affectant le riz et maladies associées. Dans l'ordre, les symptômes sont montrés pour : maladie des nématodes à galles, bactériose du riz, pyriculariose, maladie des nématodes rouges, pourriture à Pythium, helmintosporiose du riz, brûlure de la gaine du riz (Image adaptée à partir de De Vleesschauwer et al., 2013).

b) Exemple de symptômes foliaires causés par *Magnaporthe oryzae*



Figure 2. Principales maladies affectant la culture du blé

a) Diversité des principaux agents pathogènes affectant le blé et maladies associées. Dans l'ordre les symptômes sont montrés pour: rouille jaune causée par Puccinia striiformis, rouille brune causés par Puccinia triticina, rouille noire causé par Puccinia graminis, maladie tâche bronzée causée par Pyrenophora tritici, fusariose du blé causée par les champignons du genre Fusarium et Microdochium, le mildiou causée par Blumeria graminis et la septoriose causée par Zymoseptoria tritici (adapté à partir de Sarayloo & Asemani, 2015)

b) Exemple de symptômes foliaires causés par *P. triticina*

l'apparition de foyers et d'épidémies forts et à grande échelle dans les agroécosystèmes rendus plus vulnérables (Savary *et al.*, 2019)

I.1.1. Patho-système riz / *Magnaporthe oryzae*

Le riz est exposé à divers agents pathogènes qui affectent sa production (**Figure.1a**). Une des principales maladies du riz est la pyriculariose, causée par un champignon ascomycète, *Magnaporthe oryzae* (syn. *Pyricularia oryzae*) qui peut provoquer des pertes de rendement allant jusqu'à 90% à certains endroits (Khush & Jena, 2009; Shahriar *et al.*, 2020). Ce champignon est présent dans toutes les zones de production du riz, avec une intensification de son impact dans les cultures irriguées avec de forts intrants en nutriments. La maladie se manifeste sur l'ensemble des organes aériens et provoque une mauvaise circulation des éléments nutritifs, une perturbation de la photosynthèse et la mort des cellules (Fernandez & Orth, 2018). Sur la feuille, la présence du champignon peut être détectée par des lésions caractéristiques allant du vert au gris foncé (**Figure.1b**)

I.1.2. Patho-système blé / *Puccinia triticina*

La culture du blé fait face à de nombreux agents pathogènes (Figure.2,a), et les maladies associées aux rouilles provoquent des impacts agronomiques majeurs (Bolton *et al.*, 2008). Une des principales maladies foliaires est la rouille brune causée par l'agent pathogène *Puccinia triticina*, qui peut être détectée par la présence de lésions de rouge à brune sur les feuilles (**Figure.2,b**). Elle se propage sous la forme de spores qui peuvent être emportées par le vent sur des milliers de kilomètres à partir des sites d'infection initiaux.

I.2. Difficultés du système agricole actuel à gérer durablement la pression des agents pathogènes

Le modèle agricole utilisé au cours du dernier siècle a consisté en l'utilisation de variétés élites dans des systèmes de monoculture, avec un apport important de fertilisation et de produits phytosanitaires. Ce système agricole est aujourd'hui remis en cause (Tilman et al., 2002). En effet, l'évolution des rendements des principales espèces cultivées stagne depuis le début des années 1990 (Ray et al., 2012; Grassini et al., 2013). De plus l'utilisation massive de produits phytosanitaires, d'engrais chimiques, et de ressources naturelles limitées ont en effet généré de nombreux impacts négatifs sur l'environnement. Nous pouvons par exemple citer la pollution et la dégradation des sols (Lal, 2007), la pollution des eaux (Moss, 2008), ou encore les atteintes à la biodiversité (Jenkins, 2003).

Afin d'assurer la lutte contre les agents pathogènes, l'agriculture a eu recours à l'utilisation de variétés résistantes pour compléter la lutte chimique (Robinson, 2007). L'introgression par croisement de gènes de résistance dans des variétés à forts potentiels agronomiques constitue une bonne solution pour produire suffisamment et limiter grandement la pression des agents pathogènes (Seifi et al., 2013). Cependant l'utilisation de gènes de résistances dans des systèmes monovariétaux engendre une pression de sélection importante sur les agents pathogènes (Vera Cruz et al., 2000; Mundt, 2014) favorisant leur évolution rapide et leur adaptation menant à une érosion de la résistance (Mundt, 2014).

L'agriculture cherche donc de nouveaux moyens de gestion plus durables afin de limiter la pression des agents pathogènes. Pour cela, il est nécessaire d'intégrer le respect des écosystèmes et de l'environnement tout en conservant des pratiques économiquement intéressantes (Zhan et al., 2014). De plus il faut tenir compte de l'équilibre entre l'effet immédiat de tout plan de gestion sur l'incidence et la gravité des épidémies et son effet à long terme sur l'évolution des agents pathogènes (Zhan et al., 2014).

II. Quels sont les facteurs qui influencent la résistance des plantes aux agents pathogènes ?

Dans le but d'améliorer la résistance globale de nos systèmes agricoles, il est nécessaire de comprendre l'ensemble des mécanismes et des facteurs qui peuvent influencer la sensibilité des plantes à leurs agents pathogènes dans leur milieu. Comme chez les animaux, la sensibilité des plantes à leurs maladies dépend de la capacité de leur système immunitaire à empêcher le développement des agents pathogènes (Jones & Dangl, 2006).

II.1. Les défenses et le système immunitaire des plantes

Les mécanismes de défenses des plantes peuvent être divisés en deux catégories : les mécanismes passifs, souvent constitutifs, et les mécanismes inductibles.

II.1.1. Les défenses passives

Pour se protéger des agents pathogènes, les plantes possèdent des barrières morpho-anatomiques et biochimiques préformées. Elles peuvent être directes comme la cuticule qui recouvre notamment les feuilles ou comme la synthèse de composés chimiques antimicrobiens (Ferreira et al., 2006). Ces défenses peuvent aussi être indirectes comme certaines stratégies de défenses basées sur des relations de mutualisme ou de symbiose (Dini-Andreote, 2020).

II.1.2. Les défenses inductibles

II.1.2.1. La reconnaissance des agents pathogènes

Les premières défenses inductibles des plantes sont basées sur une reconnaissance par la plante des phytopathogènes au niveau des membranes des cellules végétales. Les membranes végétales contiennent de nombreux récepteurs appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui sont capables de reconnaitre de nombreux éliciteurs conservés dans l'évolution des agents pathogènes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Zipfel, 2009). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* le récepteur FLS2 reconnait spécifiquement la Flagelline (PAMP bactérien) et déclenche une réponse immunitaire chez la plante appelée PTI (PAMP-triggered Immunity) (Chinchilla et al., 2007) **(Figure.3).**

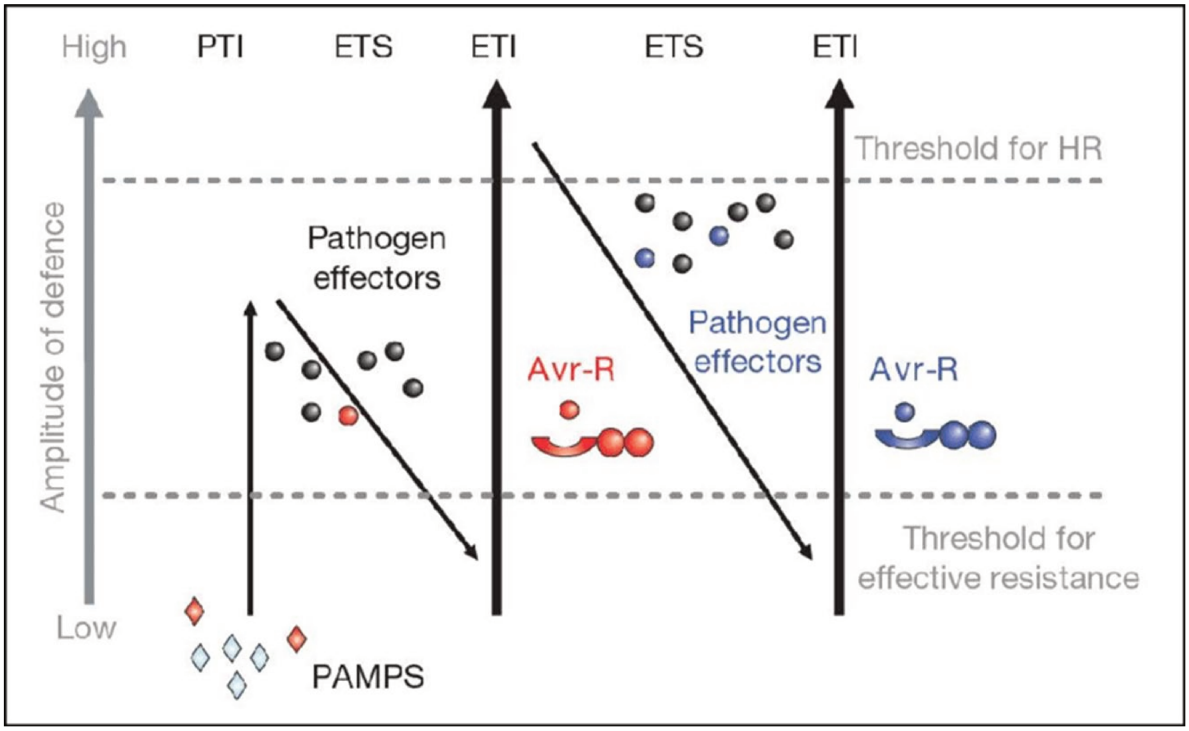


Figure 3. Schématisation du système immunitaire en Zig-Zag des plantes

L'amplitude des défenses de la plantes (et donc sa résistance) est représentée en ordonnée. Les réactions peuvent etre divisées en 4 phases :

- Phase 1 : La plante reconnait les motifs conservés (losanges) des agents pathogènes (les PAMPs) grâce à ses récepteurs PRR, ce qui mène à l'expression des défenses (PAMP-triggered Immunity) ;

- Phase 2 : Les agents pathogènes contournent les réactions de PTI en synthétisant et injectant des effecteurs (ronds) dans les cellules végétales, ce qui conduit à la sensibilité de la plante (ETS effector-triggered susceptibility) ;

-Phase 3 : Un effecteur (indiqué en rouge) est reconnu par une protéine de résistance (demi cercle associé à deux cercles), ce qui mène à l'activation de défenses plus robuste que la PTI (ETI, Effector-triggered Immunity) ;

- Phase 4 : La coévolution entre agents pathogènes et plante mène à la séléction d'agents pathogènes ayant perdu l'effecteur reconnu précédemment. Cette perte permet de contourner les réactions d'ETI de la plante et d'induire la sensbilité. Dans le même temps, La sélection favorise les nouveaux allèles de gènes de résistance des plantes qui peuvent reconnaître l'un des effecteurs nouvellement acquis, ce qui entraîne de nouveau des réactions d'ETI (D'après Jones & Dangl, 2006).

La co-évolution entre les plantes et leurs agents pathogènes a amené ces derniers à pouvoir, dans certains cas, contourner la PTI. Pour cela, les agents pathogènes vont synthétiser et injecter des protéines, appelées effecteurs, dans les cellules de la plante et inhiber la PTI. Cette stratégie d'attaque a amené les plantes à développer un autre mécanisme de reconnaissance qui a lieu à l'intérieur de la cellule cette fois-ci, appelé ETI (Effector-triggered Immunity). Elle désigne la reconnaissance directe ou indirecte des effecteurs des agents pathogènes sécrétés dans la cellule par les gènes de résistance (*R*) (Jones & Dangl, 2006; Katagiri & Tsuda, 2010; Han, 2019).

Ce dialogue moléculaire entre le pathogène et la plante hôte, aussi appelé « course aux armements » est à l'origine du niveau de sensibilité d'une plante à un agent pathogène (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2009; Peng et al., 2018) **(Figure.3).**

II.1.2.2. Transduction du signal et réponses associées à la reconnaissance

Suite à la reconnaissance des PAMPs ou des effecteurs, l'information concernant l'attaque de l'agent pathogène va être transmise et déclencher des mécanismes de défense (**Figure.4**). Cette signalisation comprend majoritairement l'activation de protéines kinases (MAPK), la production de radicaux oxygénés ou azotés (ROS / NO), une augmentation de l'influx de calcium (Ca2+), ainsi qu'une fermeture des stomates (Zeng et al., 2010; Nishad et al., 2020)

Ces signaux activent des réactions de défenses telles que la lignification des parois ainsi que des dépôts de callose, la peroxydation des lipides, la production d'un arsenal de molécules toxiques comme les ROS, des enzymes hydrolytiques et des phytoalexines. En plus d'être toxiques ces phénomènes provoquent la mort des cellules végétales les plus proches (Réaction Hypersensible) qui va isoler les agents pathogènes dans un milieu pauvre en nutriments. La PTI comprend aussi l'activation de gènes de l'immunité qui vont amener à la synthèse de protéines de défense (Yuan et al., 2021).

De plus, ces signaux sont complétés par une modification de la balance des phytohormones. Ce système permet à la plante hôte d'adapter sa réponse au type d'agresseurs, et à son mode trophique (biotrophe ou nécrotrophe par exemple). En effet, alors que l'acide salycilique (SA) favorise souvent l'activation de gènes de défenses efficaces contre les invasions des agents pathogènes biotrophes, l'acide Jasmonique (JA) favorise plutôt la résistance contre les agents pathogènes nécrotrophes (De Vleesschauwer et al., 2014). Chez le riz, ces régulations hormonales semblent plus complexes et la différence des réactions de défense contre les agents pathogènes aux différents modes trophiques pourrait se situer dans la balance d'autres

phytohormones. Par exemple L'éthylène (ET) peut agir comme un modulateur positif ou négatif de la résistance aux maladies, selon le type d'agent pathogène et les conditions environnementales. La signalisation des brassinostéroïdes (BR) et l'acide abscissique (ABA) modulent les défenses selon les stratégies d'infection/colonisation des agents pathogènes. L'auxine et la gibbérelline (GA) sont généralement considérées comme des régulateurs négatifs de l'immunité chez le riz (De Vleesschauwer et al., 2013).

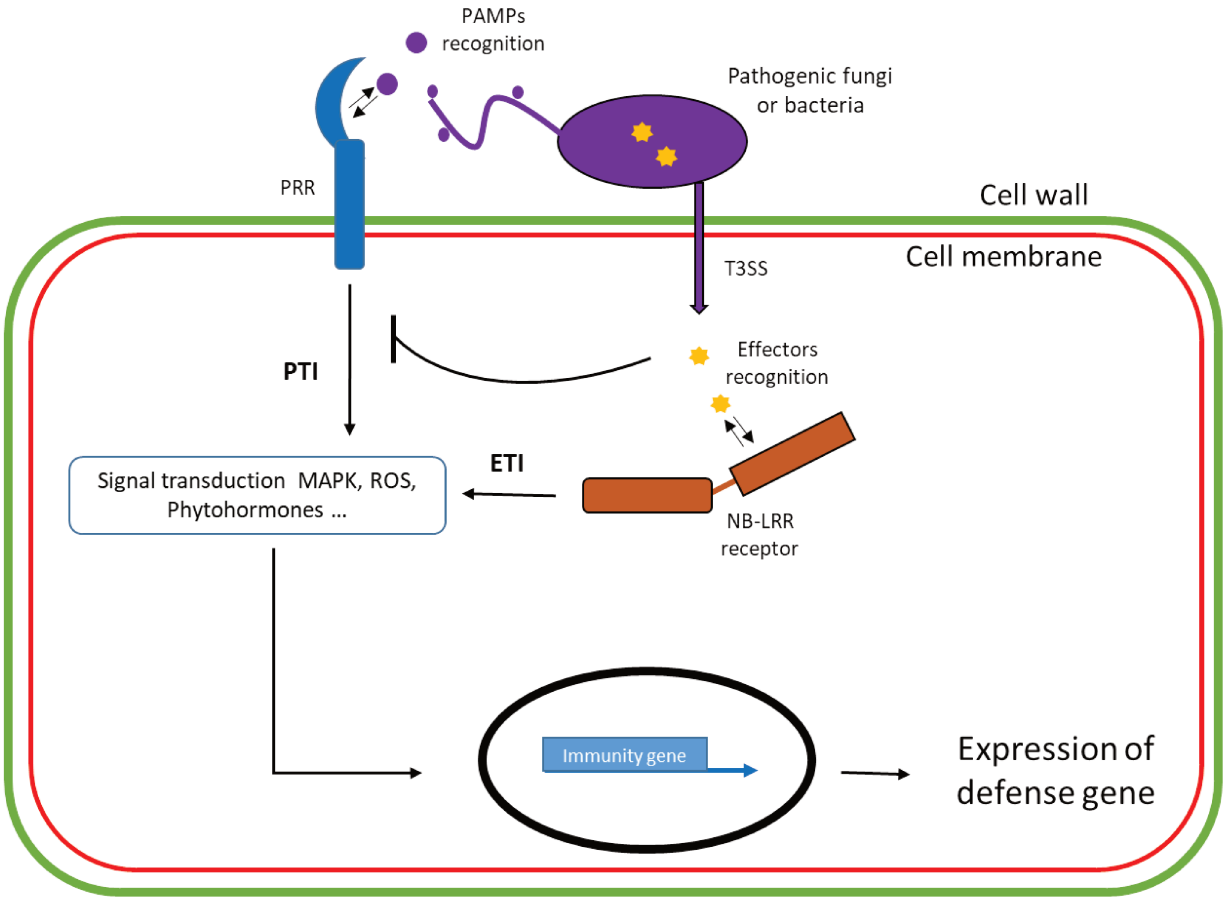


Figure 4. Modèle simplifié du système immunitaire des plantes

Les agents pathogènes sont d'abord freinés par des barrières physiques de la plante (cuticule, cire et paroi lignifiée) puis par des barrières chimiques produites de manière constitutive (phytoalexine et protéines antimicrobiennes). *Les récepteurs* PRR (Pattern recognition receptor) situés au niveau de la membrane reconnaissent les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) induisant la PTI, tandis que les protéines de résistance de type NB-LRR reconnaissent les effecteurs produits par l'agent pathogène et induisent l'ETI. La PTI et l'ETI déclenchent des réactions de défense locales et une série de signaux d'activation ou de régulation (ROS, MAPK et phytohormones). L'activation de ces signaux mène à l'expression de gènes de défenses par la cellule végétale.

II.2. L'environnement module l'immunité des plantes

Le duel moléculaire entre une plante et un agent pathogène est soumis aux contraintes de l'environnement (Scholthof, 2007; Dini-Andreote, 2020) (**Figure.5**). L'environnement est ici défini comme l'ensemble des facteurs abiotiques (climat, pedoclimat, pH, nutriments disponibles) et biotiques (microbiome, animaux). En effet, les microorganismes voient leur pouvoir pathogène modulé par les conditions environnementales comme la température, le taux d'humidité ou la lumière (El Kasmi et al., 2018; Velásquez et al., 2018). Du côté de la plante, l'environnement biotique et abiotique joue aussi un rôle important dans l'expression de son immunité (Nobori & Tsuda, 2019; Saijo & Loo, 2020).

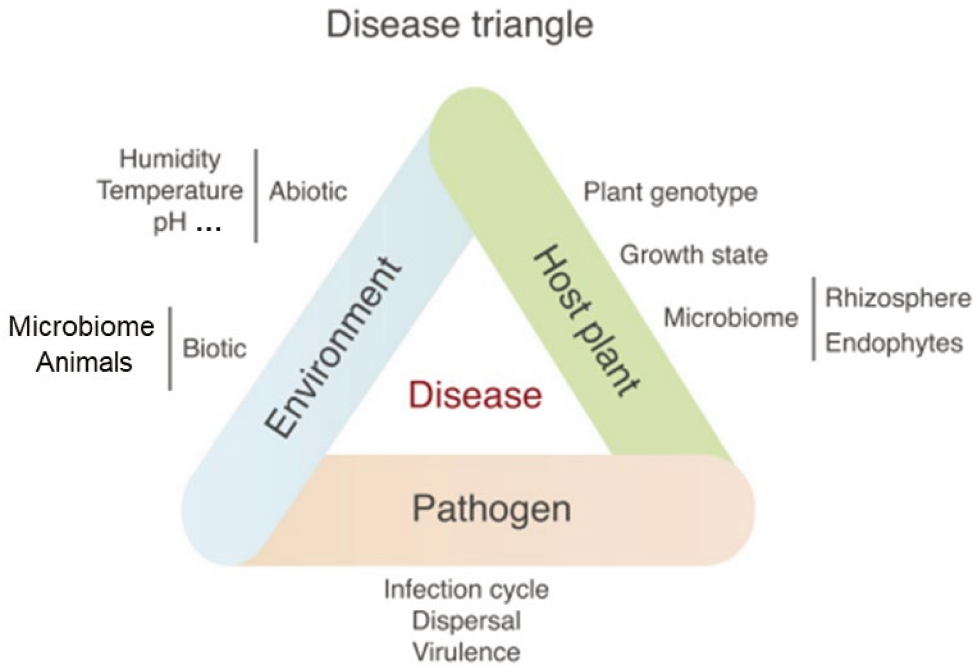


Figure 5. Triangle de la maladie

Le triangle de la maladie représente les trois facteurs principaux (hôte-pathogène-environnement) permettant le développement d'une maladie. L'apparition, la progression ou la suppression d'une maladie dépend de la manière dont les agents pathogènes interagissent avec la plante hôte et avec l'environnement qui les entoure (d'après. Scholthof, 2007)

II.2.1. Modification de l'immunité par l'environnement abiotique

Parmi les facteurs abiotiques, la lumière, l'humidité et la température sont des paramètres qui peuvent influencer l'immunité des plantes en agissant directement sur l'expression des gènes de défenses (Saijo & Loo, 2020). Par exemple, un changement d'intensité ou de radiation lumineuse peut provoquer un changement de conformation des photorécepteurs de plantes, les phytochromes. Leur changement de conformation peut modifier l'expression de l'immunité et des phytohormones impliquées dans les réponses de défense comme les brassinostéroïdes ou l'acide gibbérelique (Lozano-Durán & Zipfel, 2015; Martínez et al., 2018). Similairement, un stress par des UV-B des plantes peut induire la synthèse de flavonoïdes et modifier la résistance d'*A. thaliana* à la bactérie *Pseudomonas syringae* (Schenke et al., 2019).

La température joue aussi un rôle dans l'expression de l'immunité des plantes. Les mécanismes de défense peuvent être efficaces à certaines températures et réprimés à d'autres (Hua, 2013). Par exemple, il a été démontré qu'à des températures normales de croissance (22°C), un des systèmes de synthèse d'acide salicylique (SA) était réprimé chez *A. thaliana*. Ce système peut être activé par l'infection par un agent pathogène ou par la baisse des température (4°C) grâce à l'activation de facteurs de transcription (Kim et al., 2017).

Les conditions hydriques de l'environnement modulent elles aussi l'immunité et la résistance des plantes. Des études concernant plusieurs patho-systèmes ont mis à jour des effets du manque d'eau, tantôt négatifs et tantôt positifs, sur la réaction de la plante face à l'agent pathogène (Ramegowda & Senthil-Kumar, 2015). En effet un stress hydrique (excès ou carence) peut induire la synthèse rapide de molécules réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que d'acide abscissique (Qi et al., 2018). Au contraire, la sécheresse peut engendrer une répression des gènes de l'immunité ; c'est le cas dans le patho-système riz/*M. oryzae*, où un stress hydrique entraine une sous-expression de plusieurs gènes de défenses et une sensibilité accrue des plantes au champignon, un phénomène connu sous le nom de DIS (Drought-Induced Susceptibility) (Bidzinski et al., 2016).

La nutrition des plantes joue également un rôle prépondérant dans l'expression de l'immunité des plantes. Même si son rôle est souvent variable en fonction des patho-systèmes, la capacité d'une plante à mobiliser différentes réponses de défense est fortement affectée par les nutriments qu'elle a à sa disposition (Dordas, 2008). Par exemple, la nutrition azotée augmente souvent la sensibilité aux maladies chez les plantes, un phénomène qui peut être observé dans des conditions contrôlées et appelé NIS, pour Nitrogen-Induced Susceptibility (Ballini et al., 2013). Chez le riz, l'apport en azote a été montré comme provoquant une augmentation de

l'expression de certains gènes de défenses mais aussi des effecteurs du pouvoir pathogène, la somme des deux processus donnant lieu à une augmentation de sensibilité à *M. oryzae* (Huang et al., 2017). Parmi les autres nutriments essentiels, le phosphore a un fort impact sur l'immunité des plantes (Chan et al., 2021). Par exemple, chez l'orge, la fertilisation phosphorée peut induire l'expression de l'immunité en augmentant l'activité d'enzymes impliquées dans les défenses comme la peroxydase (POD) et la phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (Mitchell & Walters, 2004). Des exemples similaires sont connus dans l'immunité du riz (Raj & Pannu, 2017) et du maïs (Zinsou et al., 2020) en réponse à une fertilisation en potassium, le troisième macroélément essentiel, pour lequel un apport entraine une augmentation de la résistance aux agents pathogènes.

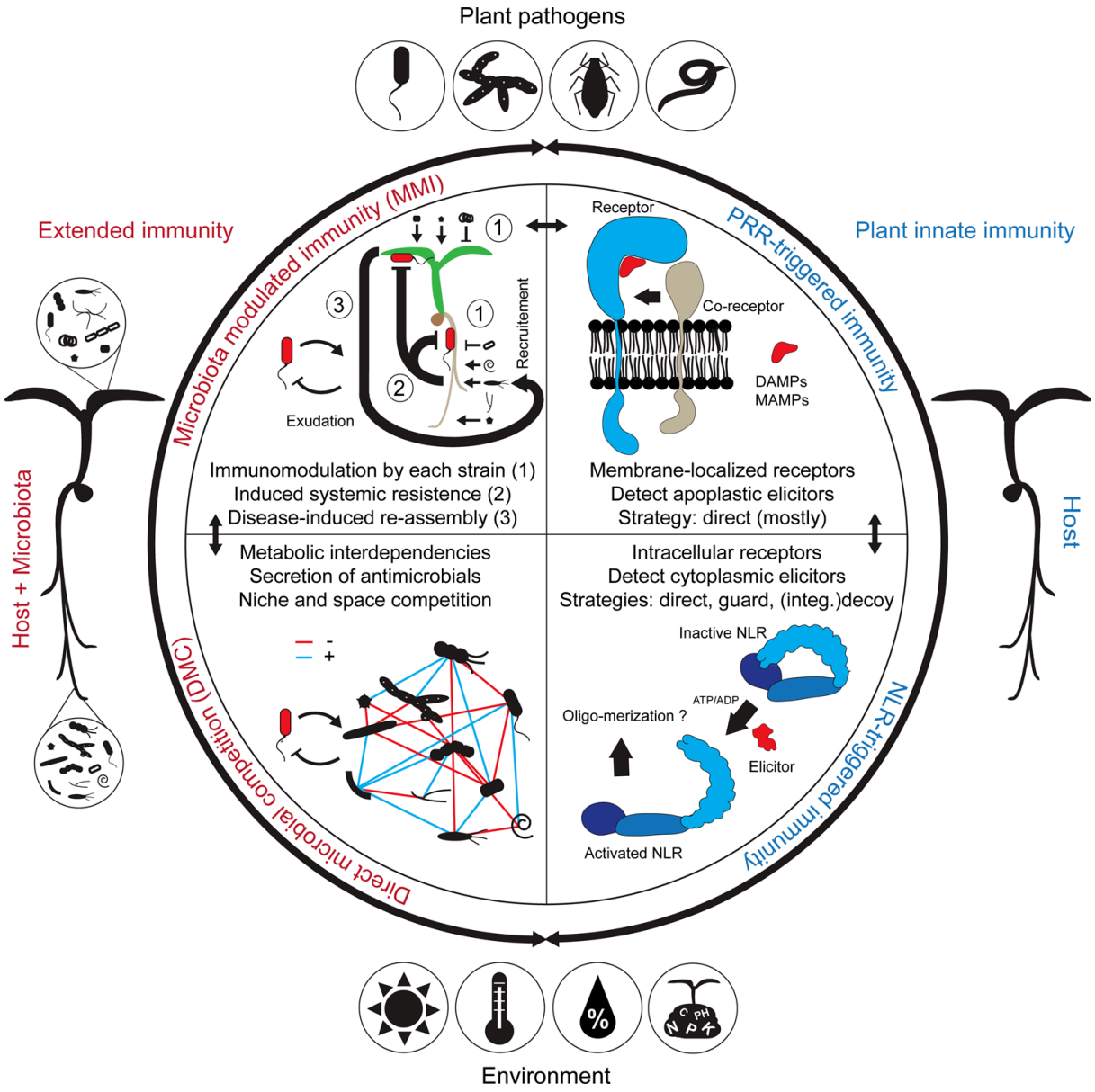


Figure 6. Modulation de l'immunité des plantes par les micro-organismes non pathogènes (MMI).

Le microbiote peut modifier directement le système immunitaire des plantes (en bleu). A l'exterieur des cellules, les microbiotes commensaux ou symbiotiques peuvent activer le système immunitaire en interagissant avec les récepteurs PRRs. A l'intérieur des cellules certains élliciteurs du microbiote peuvent aussi modifier la conformation des récepteurs NLRs des plante et modifier l'immunité.

Indirectement (en rouge), le microbiote végétal fournit une activité protectrice directe contre les agents pathogènes microbiens: DMC (Direct Microbial Competition). La DMC comprend la compétition pour les nutriments et l'espace ainsi que la sécrétion de molécules antibiotique qui vont affecter la croissance des autres microorganismes et insectes. Par ailleurs ces interactions sont intégrées dans un réseau complexe qui *détermine* la croissance des agents pathogènes in planta et l'expression du système immunitaire (MMI). (d'après Vannier et al., 2019).

II.2.2. Modification de l'immunité par l'environnement biotique

En dehors des agents pathogènes et des parasites, les plantes sont aussi en constante interaction avec d'autres organismes : les symbiotes et plus généralement le microbiome, les animaux ainsi que les plantes elles-mêmes.

L'interaction avec des microorganismes symbiotiques peut influencer la physiologie des plantes : acquisition des ressources des plantes et leur croissance (Larimer et al., 2010), impact sur l'immunité des plantes (Zipfel & Oldroyd, 2017). Le microbiome, qui inclut l'ensemble des communautés microbiennes (symbiote ou non) qui peuvent vivre et interagir avec l'ensemble des tissus de la plante, est souvent spécifique et complexe (Haney & Ausubel, 2015) et il peut aussi impacter l'expression des défense à l'instar des symbiontes (Vannier et al., 2019) **(Figure.6**). En effet tous les microbes vivants, qu'ils soient commensaux, symbiotiques ou pathogènes, expriment des motifs moléculaires conservés chez les microbes appelés MAMPs (Microbes-Associated-Molecular Pattern). Ces motifs sont reconnus par les récepteurs PRRs (voir chapitre 1) et peuvent induire les réponses immunitaires de la plante, même dans le cas de bactéries commensales (Hacquard et al., 2017), un phénomène connu sous le nom de ISR (Induced Systemic Resistance) (Pieterse et al., 2014).

Par ailleurs, dans leur environnement les plantes sont aussi très souvent soumises à l'interaction avec des animaux. Ainsi les attaques, les morsures ou encore les piqures d'insectes peuvent induire l'expression système immunitaire des plantes par divers mécanismes (perception de molécules associées au dommages des cellules végétales par exemple, Jones & Dangl, 2006; Howe & Jander, 2008). Récemment, il a aussi été démontré que le simple toucher, en l'absence de dommage, pouvait modifier la physiologie (Lee et al., 2005; Chehab et al., 2012) des plantes et affecter leur immunité (Markovic et al., 2019; Douma & Anten, 2019).

Il est intéressant de constater que dans les revues récentes traitant des recherches sur l'impact de l'environnement sur l'immunité des plantes (Velásquez et al., 2018; Cohen & Leach, 2019; Nobori & Tsuda, 2019; Saijo & Loo, 2020), et hormis les plantes parasites de plantes, les plantes elles-mêmes ne sont jamais considérées comme un facteur pouvant influencer l'immunité des plantes (voir plus loin).

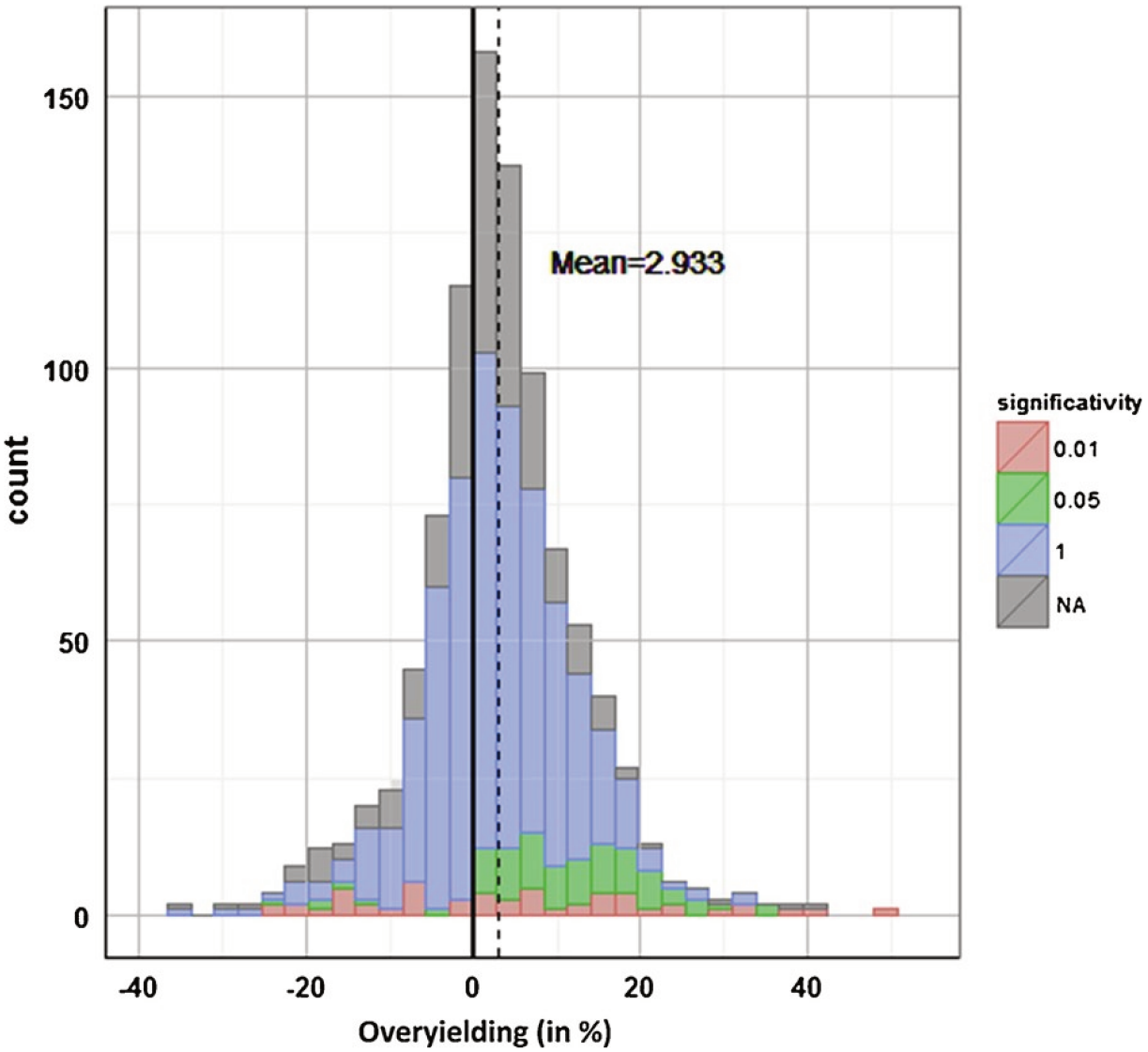


Figure 7. Distribution des augmentations de rendement analysés dans l'étude de Borg et al. 2018

Distribution des valeurs d'« overyielding » (pourcentage d'augmentation du rendement des mélanges en comparaison avec leur rendement en monoculture) utilisées pour la méta-analyse (120 publications) de Borg et al. 2018. Les barres vertes et roses représentent les valeurs rapportées comme significatives (valeur p0.05 et 0.01 respectivement), les barres bleues sont les valeurs non significatives, et les barres grises sont les valeurs avec un test de significativité manquant.

III. La diversité, un levier prometteur pour l'agriculture

En agriculture comme en condition naturelle, une plante pousse rarement sans un voisin végétal. L'intensification de l'agriculture a mené à une réduction drastique de la diversité génétique dans les systèmes cultivés (Bommarco et al., 2013). De ce fait, les plantes se retrouvent souvent à côté de leurs clones dans des systèmes de monoculture. Pourtant la diversité des plantes cultivées peut avoir de nombreux effets bénéfique en agriculture.

III.1. La diversité au service de la production en agriculture

La réintroduction de diversité dans les champs cultivés montre de bons résultats dans la réduction des apports en fertilisation, des pesticides et l'amélioration de la gestion de l'environnement (Gaba et al., 2015). Différents niveaux de diversité peuvent être utilisés en agriculture, via l'utilisation de mélanges d'espèces (hétérospécifique) de génotypes différents au sein de la même espèce (intra-spécifique).

Le mélange d'espèces est notamment utilisé en agriculture pour tous les services éco-systémiques qu'il peut rendre (Keesstra et al., 2018). La culture en mélange de deux espèces agronomiques peut en effet augmenter le rendement des deux plantes d'intérêts par des mécanismes de facilitation et en réduisant la compétition entre les deux espèces (Li et al., 1999; Qin et al., 2013). Il permet notamment une meilleure exploitation des ressources du système dans des environnements pauvres en ressources, mais aussi d'accroitre la biodiversité, de contrôler la pressions des adventices ou encore d'améliorer la qualité du sol (Dong et al., 2018). Parmi les nombreux exemples de cultures d'espèces associées, nous pouvons citer la culture commune du maïs et de la fève qui permet d'augmenter les rendements respectifs de 46% et de 26% (Li *et al.*, 2007a).

Au sein d'une espèce, la diversité génétique a aussi avoir un effet positif sur l'augmentation du rendement et sur sa stabilité (**Figure.7**). (Li *et al.*, 2014a; Reiss & Drinkwater, 2018). Reis et Drinkwater ont notamment montré que le rendement de mélanges variétaux était supérieur de 2,2% au monoculture en analysant plus de 200 études. Ce gain de rendement était d'autant plus fort lorsque les cultures sont soumises à une pression de la part des agents pathogènes (Borg et al., 2018). Cependant bien que les mélanges variétaux permettent en moyenne de produire plus et d'augmenter la stabilité des rendements dans le temps, leur impact sur les rendements restent très variables (**Figure.7**) suggérant plusieurs mécanismes impactant le rendement (Barot et al., 2017; Borg et al., 2018).

L'accroissement de la biodiversité dans les systèmes cultivés est donc considéré comme un levier prometteur pour améliorer la durabilité de l'agriculture (Tilman et al., 2002), en particulier pour atténuer l'impact des maladies (Stenberg, 2017).

III.2. L'impact de la diversité sur les maladies en agriculture

En plus d'augmenter la productivité des agro-systèmes, la diversité permet aussi une meilleure gestion des maladies. En effet, sur 206 études analysées, le mélange d'espèces (« intercropping») permet de réduire la maladie dans 73% des cas (Boudreau, 2013). Par exemple, une réduction de 20 à 40% du développement de l'agent pathogène *Pyrenophora teres* a été observée sur l'orge cultivée en présence d'autres espèces végétales (Hauggaard-Nielsen et al., 2008). Une réduction similaire a été observée dans le système triticale-fève où la présence du triticale peut induire une réduction allant jusqu'à 60% de l'agent pathogène *Mycosphaerella pinodes* sur la fève (Fernández-Aparicio et al., 2010).

Au niveau intra-spécifique, le mélange de variétés d'une même espèce a été appliqué avec succès au champs pour lutter contre les principaux agents pathogènes foliaires, notamment la septoriose et la rouille du blé (Kristoffersen et al., 2020) et la pyriculariose du riz (Zhu et al., 2000; Raboin et al., 2012). Dans de tels mélanges de variétés, les gènes de résistance ont de fortes répercussions négatives sur la dispersion des agents pathogènes (Burdon et al., 2014) et sont moins facilement susceptibles d'être contournés (Garrett & Mundt, 1999; Burdon et al., 2014). Cependant, le choix de composants variétaux ayant une grande aptitude au mélange reste un défi car tous les assemblages ne se valent pas (Barot et al., 2017). En particulier, des mélanges variétaux pour lesquels l'immunité est finement régulée par les interactions plante-plante (Zhu & Morel, 2019) pourrait être un levier pour renforcer la résistance et la durabilité en limitant la taille des populations des agents pathogènes.

IV.Effets des interactions plantes – plantes sur les maladies des végétaux

La réduction des maladies en systèmes diversifiés peut être due à différents mécanismes opérant à des échelles différentes. Premièrement, au niveau du champ ou de la parcelle, les mélanges de plantes (inter- ou intra- spécifique) peuvent limiter la dispersion ou la reproduction de l'agent pathogène par des processus épidémiologiques (**Figure.8**). Des observations indiquent cependant que la sensibilité des plantes pourrait être modifiée directement par les interactions physiologiques entre les plantes.

IV.1. Mécanismes impliquant la propagation de l'agent pathogène

IV.1.1. Barrières physiques à la dispersion et reproduction des agents pathogènes par les plantes voisines

Les plantes peuvent constituer des barrières physiques à la dispersion d'un agent pathogène. Dans un système diversifié où plusieurs espèces végétales sont mélangées (« intercropping »), la présence de plantes non hôtes d'un agent pathogène peut freiner sa dispersion ou entrainer sa mort en bloquant sur son cycle de développement (Gaba *et al.*, 2015) **(Figure.8)**. Ce type de phénomène a été notamment été observé dans les mélanges pois – blé. Dans cet exemple, l'incidence et la sévérité de l'agent pathogène *M. pinodes* est réduit sur le pois par deux mécanismes: (i) le blé constitue une barrière physique à la dispersion des spores et (ii) il dilue la pression de l'inoculum en réduisant le nombre de spores présent sur les plante de pois (Fernández-Aparicio et al., 2010).

De tels exemples sont aussi visibles dans les mélanges variétaux (Garrett & Mundt, 1999). En effet le mélanges de variétés résistantes et sensibles en champs peut conduire aux mêmes mécanismes de dilution d'inoculum et de barrières à la dispersion des agents pathogènes. Ces mécanismes ont été appliqués avec succès notamment dans le contrôle de la pyriculariose du riz en champs (Zhu *et al.*, 2000) et de la septoriose et la rouille des feuilles du blé (Kristoffersen *et al.*, 2020). Ces effets nécessitent plusieurs cycles de développement des agents pathogènes pour être visibles. Ils modifient souvent l'incidence d'un agent pathogène (le pourcentage de plantes malades au champ). Dans ces situations, le niveau de maladie provoqué par une spore individuelle n'est lui pas modifié car le niveau de sensibilité de chaque plante est inchangé.

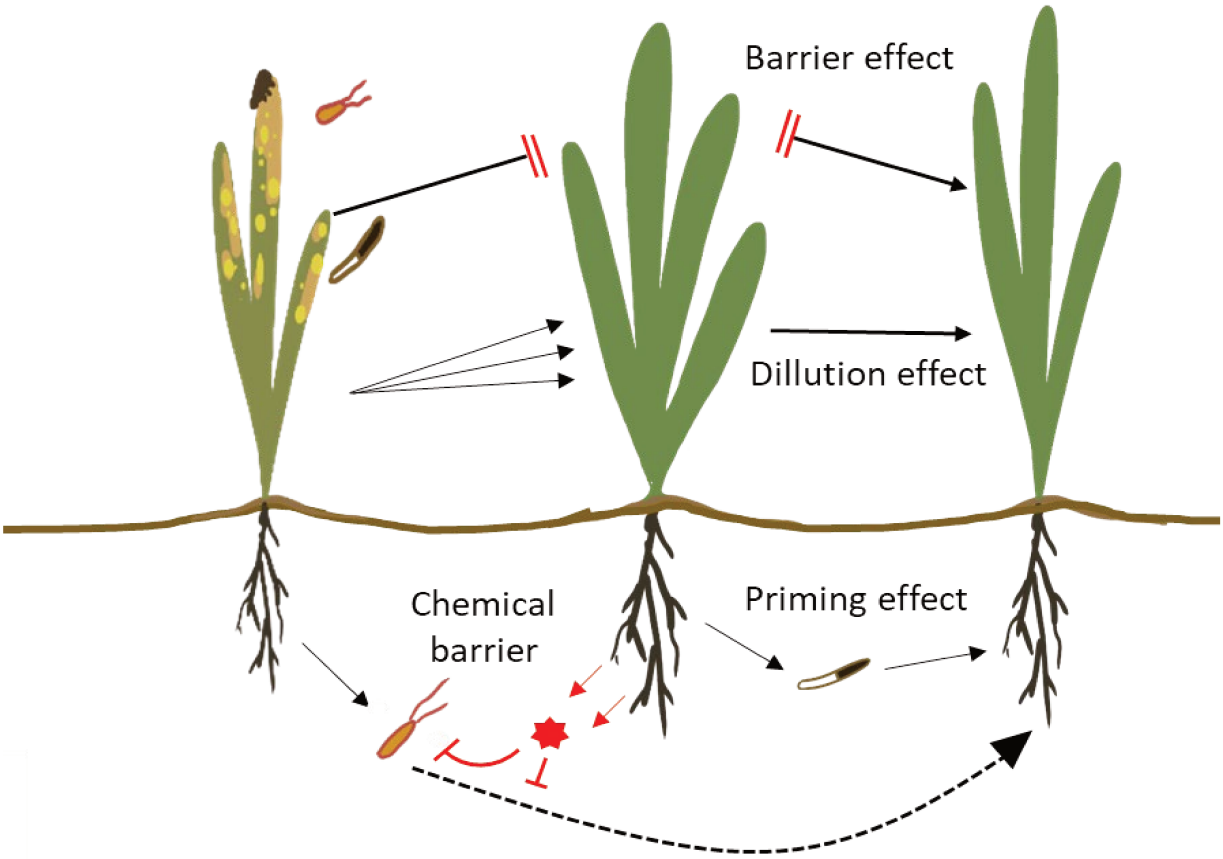


Figure 8. Processus épidémiologiques agissant en condition naturelle et pouvant expliquer la réduction de pression des agents pathogènes en système diversifié

En condition naturelle, la réduction des maladies observée en système diversifié (mélange de variétés ou mélange d'espèces) peut être d*û* à différents effet *: effet* barrière *par lequel* les plantes non sensibles à l'agent pathogène constituent une barrière physique à sa dispersion, effet de dillution *dans lequel la* quantité d'inoculum *est* réduit*e* sur les plants sensible*s* du *fait de l*a dispersion des spores entre les plants sensible*s* et résistants. Les plantes voisin*es* peuvent aussi produire des composés allélopathiques qui vont inhiber la croissance ou tuer des agents pathogènes. Enfin les micro-organismes associés à une plante peuvent induire des effets de priming sur les plantes voisines et induire l'expression de leur système immunitaire.

IV.1.2. Barrières chimiques produites par les plantes voisines

Les plantes produisent dans l'environnement un cocktail de molécules dans le sol et dans l'air. Ces molécules sont majoritairement des métabolites secondaires (Kong *et al.*, 2019). En plus d'avoir un effet sur les plantes voisines, certaines de ces molécules peuvent avoir des propriétés antimicrobiennes (Massalha *et al.*, 2017). Ces métabolites peuvent donc modifier la composition du microbiote du sol, et en particulier inhiber les agents pathogènes et réduire les maladies associées. Alors que les agents pathogènes sont souvent adaptés à leur plante hôte, et ont alors la capacité de contourner leurs mécanismes de défense, la présence de molécules d'autres plantes non hôtes dans un système diversifié peut amener à la réduction des agents pathogènes du sol, tout en réduisant leur capacité d'adaptation (Zhu & Morel, 2019)**(Figure.8)**.

Ainsi, il a été montré que la culture de maïs et de poivron permet de réduire significativement l'incidence et la sévérité de l'agent pathogène *Phytophtora capsicii* sur les racines du poivron. Les racines de maïs produisent et relâchent dans le sol des composés nommés 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) et 6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA). Ces métabolites secondaires de la famille des benzazoïdes sont capables d'attirer et de tuer les zoospores de *P. capsicii* et ainsi protéger le poivron dans un système de mélanges Poivron/Maïs (Yang *et al.*, 2014).

Quelques exemples de COVs (Composés Organiques Volatiles) ont été montrés comme pouvant avoir des effets antimicrobiens et réduire la croissance des agents pathogènes (Rodriguez-Saona & Frost, 2010; Reiter *et al.*, 2017). Par exemple la molécule volatile allicine, produite par les plantes de la famille des Allium comme l'Ail ou l'Oignon (Reiter *et al.*, 2017), peut avoir de nombreux effets antimicrobiens contre un spectre large d'agents pathogènes végétaux (Curtis *et al.*, 2004).

IV.1.3. Induction des défenses ou « priming » par les agents pathogènes des plantes voisines

Lorsque les agents pathogènes ne sont pas adaptés à une plante, leur présence peut entrainer des réactions de type non-hôte. Ces réactions comprennent parfois l'activation des systèmes de défense de la plante (Heath, 2000). Ces réactions amènent donc à une induction de l'immunité de la plante qui devient plus résistante contre les futurs stress biotiques (« defense priming») (Conrath, 2011). Dans un système diversifié, la présence de plusieurs espèces de plantes peut amener à la co-présence de plusieurs agents pathogènes dont ceux, non adaptés, peuvent déclencher une induction de l'immunité par un phénomène de «priming ». L'induction des défenses d'une plante est donc possible par les agents pathogènes produits par son voisinage

(par ex.Ding *et al.*, 2015). Ce phénomène a aussi été décrit dans des situations de mélanges de deux variétés présentant des niveaux de sensibilités différentes à un agent pathogène (Mundt, 2002)**(Figure.8)**.

Ce processus d'immunité induite constitue un exemple dans lequel une plante voisine est capable, via un agent pathogène qui intervient comme intermédiaire dans les interactions entre plantes, de modifier l'immunité d'une autre plante. Il existe d'autres situations, décrites ci-dessous, dans lesquelles les interactions directes entre plantes (interactions plante-plante) peuvent modifier l'immunité et ou la sensibilité des partenaires de l'interaction, sans intervention d'un agent pathogène intermédiaire et donc en l'absence d'épidémie.

IV.2. Modification de sensibilité par les interactions plantes – plantes en l'absence d'épidémie.

Les différents mécanismes, processus et exemples concernant la modification de sensibilité et d'immunité par des interactions plantes-plantes ont été résumés dans une revue publiée en Août 2021 dans la revue Current Opinion in Plant Biology.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in Plant Biology

Plant immunity: Good fences make good neighbors?

Rémi Pélissier[1], Cyrille Violle[2] and Jean-Benoit Morel[3]

Abstract

Plant immunity is modulated by several abiotic factors, and microbiome has emerged as a major biotic driver of plant resistance. Recently, a few studies showed that plants also modify resistance to pests and pathogens in their neighborhood. Several types of neighborhood could be identified depending on the biological processes at play: intraspecific and interspecific competition, kin and stranger recognition, plant-soil feedbacks, and danger signaling. This review highlights that molecules exchanged aboveground and belowground between plants can modulate plant immunity, either constitutively or after damage or attack. An intriguing relationship between allelopathy and immunity has been evidenced and should merit further investigation. Interestingly, most reported cases of modulation of immunity by the neighbors are positive, opening new perspectives for the understanding of natural plant communities as well as for the design of more diverse cultivated systems.

Addresses

[1] PHIM Plant Health Institute, CEFE, Univ Montpellier, Institut Agro, INRAE, CIRAD, TA A-54/K Campus International de Baillarguet, 34398, Montpellier Cedex 5, France

[2] CEFE, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Univ Paul Valéry, Campus du CNRS, 1919, Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

[3] PHIM Plant Health Institute, Univ Montpellier, INRAE, CIRAD, Institut Agro, IRD, TA A-54 / K Campus International de Baillarguet, 34398, Montpellier Cedex 5, France

Corresponding author: Jean-Benoit, Morel (jean-benoit.morel@inrae.fr)

Current Opinion in Plant Biology 2021, **62:**102045

This review comes from a themed issue on **Biotic interactions**

Edited by **Jeffery L. Dangl** and **Jonathan D G Jones**

For a complete overview see the Issue and the Editorial

Available online xxx

https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102045

1369-5266/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Introduction

Plants possess a basal immune system that is constitutively expressed at low levels and can be induced by pathogens [1]. The expression of this immune system confers basal levels of immunity and leads to full or partial resistance to pathogens and insects. Plants, which integrate complex external cues and signals throughout their life span, can be considered as 'multilayer perceptrons' [2]. Environmental factors, whether abiotic [3] or microbiotic [4], can modulate their basal immunity. In particular, in their natural habitat, plants grow and compete with other plants. Plant–plant interactions can modify plant physiology [5*], as manifested for instance by massive transcriptional changes; plant–plant interactions also affect their interactions with other organisms, for example, the plant microbiome [6,7]. However, little attention has been paid to plants themselves as neighbors and their possible ability to modulate basal immunity and pathogen resistance [8].

Plant–plant interactions are mediated by cues (constitutively produced) and signals (induced by different triggers) from emitter/neighbor plants and perceived by receiver/focal plants [7,9]. Numerous studies have shown that plant–plant interactions, notably mediated by volatile organic compounds (VOCs), influence the resistance to herbivorous insects of a focal plant [10]. This is ecologically consistent with the elevated mobility of insects and the requirement of biological systems that protect the population and not just individual plants. Besides, very few studies report on the impact of plant–plant interactions on resistance to pathogens [11]. This sounds logical for threats such as pathogens that have limited mobility in the environment. However, recent but still sparse evidences now indicate that plant–plant interactions can strongly modify plant immunity and resistance not only to insects but also to many pathogens. This understudied capacity of plants to interact with each other and to fine tune immunity raises many questions, including on the underlying biological processes and on the ecological significance of such a behavior.

As a step to the development of a comprehensive framework for plant–plant interactions influencing their response to biotic stresses, we review recent findings on the modification of immunity and susceptibility due to plant–plant interactions (Table 1), the mechanisms by which these modifications occur, and the signals or cues exchanged between plants that are responsible for these modifications (Figure 1). We first asked whether such phenomenon could be influenced by the genetic distance between plants, by distinguishing genetically close neighbors (conspecifics) vs. plants of different species (heterospecific). We also

Table 1

Recent and key studies showing modulation of plant defense by plant–plant interactions or signals involved in plant–plant interactions.

Process	Nature of the signal (localization)	Focal plant	Neighbor plant or signal	Immune and resistance response in focal plant	Reference
Competition	*Change of light quality (Aboveground)*	*A. thaliana*	Synthetic change of light	Defense gene downregulated (*ERF1*, *PDF1.2*) Susceptibility to *B. cinerea* increased	[14,15]
	Root density (Belowground)	*Nicotiana rustica*	*Nicotiana rustica*	Increase of chemical defense, SA, JA, ABA	[16]
	Plant density (Below- Above-ground)	*Asclepias syriaca* *Triticum aestivum*	*Asclepias syriaca* *Triticum aestivum*	Increase of lignin production and deposition on secondary cell wall.	[17,18]
Kin recognition	Root exudates (Belowground)	*A. thaliana*	*A. thaliana*	Defense gene upregulated (*PR1*, *PDF1.3*, *PDF1.2b*, *CA1*)	[21*]
Stranger recognition	DIMBOA and derivatives (Belowground)	*A. thaliana*	Synthetic molecule	Inhibition of histone acetylation and enhanced expression of stress-related genes	[28**]
	Allantoin (Belowground)	*A. thaliana*	Synthetic molecule	Activation of the *MYC2*-regulated JA signaling pathway through ABA production	[30]
	(–)-Loliolide (Belowground)	*Oryza sativa*	Echinocloa Crus-gali	Increased synthesis of tricin, momilactone and expression of genes involved in defense	[31]
	(–)-Loliolide (Belowground)	*A.thaliana* *Solanum lycopersicum*	Synthetic molecule	Defenses genes and herbivory resistance increased	[32]
	(–)-Loliolide, JA and other (Belowground)	*Triticum aestivum*	100 other species	Increase of DIMBOA production	[25*]
	1,8-cineole, menthone and menthol (Aboveground)	*Glycine max* and *Brassica rapa*	*Mentha piperita*	Defenses genes and herbivory resistance increased	[22*]
	sesquiterpene (E)-β-caryophyllene (Belowground)	*Centaurea stoebe*	*Taraxacum officinale*	Increased herbivory	[59]
	Diallyl disulfide (Belowground)	*Solanum lycopersicum*	Synthetic molecule	Defense gene and pathogenesis-related proteins upregulated	[27]
Plant-soil Feedbacks and legacies	Modification of soil microbiota (Belowground)	*A. thaliana*	*A. thaliana*	Defenses genes and *H. arabidopsidis* resistance increased	[35**]
	Modification of soil microbiota (Belowground)	*Zea mays*	*Zea mays*	Defenses genes (*PR10*,*OX10*,*PR1* etc..), SA, JA and herbivory resistance increased	[35**]
	Modification of soil microbiota (Belowground)	*Jacobaea vulgaris*	*Jacobaea vulgaris* (damaged or undamaged)	Increase of pyrrolidine alkaloid concentration	[36*]
	Modification of soil microbiota (Belowground)	*A. thaliana*	*A. thaliana* infected by *P. syringae*	Defense metabolism and *P. syringae* resistance increased	[38]
	Modification of soil microbiota (Belowground)	*D. grandiflora*	37 other species	Resistance to *P. ultimum* and concentration of chlorogenic acid increased	[34]

Danger signalization	Systemin (excreted soil peptide) (Belowground)	*S. lycopersicum*	Damaged *S. lycopersicum*	Defenses genes (*WRKY40*, *Ap2ERF* etc..) and herbivory resistance increased	[75]
	Unknown root exudate compound (Belowground)	*A. thaliana*	*A. thaliana* infected by *P. brassicae* eggs	Transmission of SAR reaction, SA induction and resistance against *P. brassicae* increased	[49**]
	Inducible VOCs emission (Aboveground)	*Zea mays*	Touched *Zea mays*	Defenses genes (*APX*, *BX1*, *SOD* etc..), and herbivory resistance increased	[76*]
	Inducible monoterpene emission (Aboveground)	*A. thaliana*	*A. thaliana* infected by *P. syringae*	Transmission of SAR reaction, defense gene (*PR1*) and resistance against *P. brassicae* increased	[48**]
	Inducible α-pinene, β-myrcene, and limonene (Aboveground)	*Glycine max*	Cut Goldenrods (Solidago spp.	Herbivory resistance against *S.litura* and seed isoflavone increased	[53**]
	Inducible cis-3-hexenyl acetate (Aboveground)	*P. lunatus*	Synthetic z3HAC	Herbivory resistance increased	[51]

ABA, abscisic acid; **z3HAC**, cis-3-hexenyl acetate.

reviewed studies showing that plant–plant interactions occur across time, with one plant influencing immunity and resistance of another plant that succeeds to the former. Finally, besides the intuitive notion that an attacked/damaged plant can signal danger to its neighbor, there is now evidence that healthy neighbors can also modify immunity and resistance in their neighborhood. We further discuss the ecological and agronomical implications of these findings and highlight the major lines of research which, to our opinion, should be followed (Box 1).

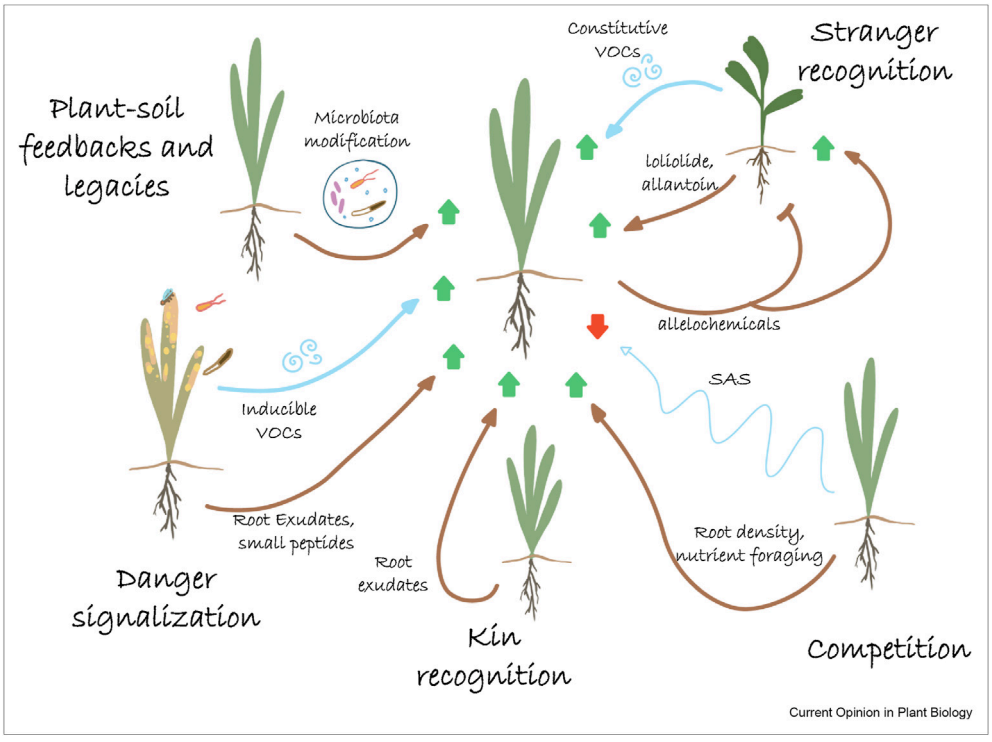
Main text of review

Conspecific neighborhoods can modulate plant susceptibility

The intensity of plant–plant interactions increases with density and is associated with competition for resources (e.g., soil nutrients and light) [12]. Importantly, competition can induce multiple physiological and transcriptomic changes within the plant [5]. A well-known example is the cascade of reactions triggered by the shade-avoidance syndrome on competition for light [13], including a reduction of the expression of defense-associated genes and resistance to pathogens [14,15]. Aboveground defenses on the contrary can be induced by increased root–root interactions. For instance, the presence of intraspecific tobacco roots was associated with the accumulation of defense chemicals like phenolic compounds and lignin derivatives that participate to mechanical defenses [16]. These changes were accompanied by the enhanced accumulation in leaves of phytohormones implicated in defense, such as jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), and abscisic acid. Other studies indicated that plant density affects components of plant immunity but did not test its impact on plant susceptibility to biotic stresses [17,18]. Except for these few examples, belowground competition and its impact on plant immunity has been overlooked and deserves further investigation.

Besides responding to neighborhood density, there is evidence that plants can identify their kins, in particular by perceiving root exudates in the soil [7,19]. On the one hand, genetic relatedness has been shown to modify the defense response of one focal plant to signals from neighboring, attacked plants [10,20]. On the other hand, in the absence of danger, only one example shows a possible effect of genetic relatedness in the expression of immunity [21]. In this case, the induction of defense genes in *Arabidopsis thaliana* by root exudates was higher with exudates produced by a genetically distant ecotype. However, it remains to be demonstrated whether kin recognition per se can modify plant susceptibility (Box 1).

Figure 1



Conceptual framework for plant–plant interactions modulating immunity and susceptibility. Plant neighbors interact with a focal plant (at the center) by producing above and below ground signals (blue and brown arrows, respectively; arrowheads indicate activation and broken arrow inhibition). On interaction, the immune system or resistance of the focal plant is increased (green arrows) or reduced (red arrow). Five types of processes resulting from plants neighborhoods are defined: Plant-soil feedbacks and legacies, danger signalization, kin or stranger recognition and competition. Plant-soil feedbacks and legacies are situations where plants precondition soil, often through microbiome modifications, in such a way that the next growing plants have their immunity/susceptibility modified. Danger signalization represents situations where attacked or damaged plants send signals in their neighborhood. Kin and stranger recognition (allelopathy) represents cases where the genetic distance between plants trigger signals. Competition represents situations where the response to neighbors does not require signaling but rather is an indirect consequence of competition for resource. Except for the shade-avoidance syndrome, most interactions are positive. During the allelopathic response (stranger recognition), both neighbor and focal plants have their immunity modified. The list of studies behind this framework can be found in Table 1.

Constitutive cues and induced signals from heterospecific, healthy neighbors: *strangers' things*

Several studies have now demonstrated that the presence of neighbors from different species (heterospecifics) affects plant immunity (Table 1). Constitutive cues produced by heterospecific neighbors are a first category of signals that can affect immunity in their neighborhood. When co-cultivated with mint, soybean showed reduced herbivory both in the field and in controlled conditions [22*]. Volatile menthol constitutively released from mint was responsible for this increase of resistance by enhancing the expression of defense genes like *PR1* in soybean. This enhancement of immunity occurred through the targeting and regulation of histone acetylation on promoters of defense-associated genes.

Plants also produce a cocktail of allelopathic molecules in response to their plant neighborhood [23,24]. In some instances, it is likely that these allelopathic molecules lead to broad effects besides their known herbicidal activities on plant neighbors. For instance, the secondary metabolite DIMBOA produced by many Poaceae species in response to neighbors (e.g., [25*]) is well known for its direct antimicrobial and insecticidal activities [26]. Thus some neighbors and the allelopathic response they trigger could indirectly increase resistance to pathogens and pests [11,27].

Some molecules known to participate to the allelopathic response were also shown to directly modulate the expression of genes involved in defense and resistance to biotic stress (Table 1). One of the earliest report of such indirect effects of allelopathic compounds was that DIMBOA, by modifying some specific histone deacetylases, increased the expression immunity-related genes [28**]. More recently, the ureide allantoin (involved in kin recognition in rice [29]) has been shown to induce the expression of JA-responsive genes as well as *MYC2*, a key gene known to mediate defense against

Box 1. Outstanding questions.

- Only limited information exists on the link between genetic distance (including kinship recognition) and immunity levels in conspecific plant mixtures. Exploring this link would have broad implications in agronomy. In particular, establishing the required level of diversity between varieties to produce significant enhanced immunity is critical for designing varietal mixtures.
- Allelochemicals are particularly important in heterospecific plant–plant interactions. Understanding how these chemicals interfere with hormone-regulated defense pathways would help disentangle the relationship between the immune response and the response to plant neighbors. Given their broad impact on gene regulation, allelochemicals could also affect major resistance genes. Some allelochemical such as DIMBOA, allantoin, or loliolide, for which mutants exist, are good models to address these questions.
- Allelochemicals leave messages in the soil that future generations translate into immunity levels. Following the evolution of the composition of plant communities in soil that was or not preconditioned with such allelochemicals, in combination with pathogen pressure, would help evaluating the strength of such process in shaping plant communities.
- In natural communities, taking into account altruistic traits such as those observed in plant–plant interactions would help understanding how competition can be counter-balanced.
- In field studies, establishing the respective contributions of dilution effects and immunity due to plant–plant interactions to crop protection in varietal mixtures is key to improve such practices.

pathogens in *A. thaliana* [30]. Similarly loliolide, a secondary soil-secreted metabolite shown to activate an allelopathic response in rice [31] and wheat [25], induced plant defense and increased herbivore resistance in *A. thaliana* and tomato [32]. There is a thus a potentially complex interplay between the recognition of a stranger, the mechanisms that plants activate in response to such neighborhood and immunity (Fig. 1). However, it remains to be shown whether and how the actual plant–plant interactions involving loliolide or allantoin can modulate immunity and resistance to biotic stress. More generally, the intriguing relationship between allelopathic and immune responses remains to be further explored (Box 1).

Plants leave a message: plant-soil feedbacks and legacy effects

By modifying soil properties, in particular through the production of allelopathic compounds, plants have also an effect on soil microbial communities [33]. Recently, several studies showed that the modification of soil microbes by plants can alter the defense responses or resistance properties of plants grown in pre-conditioned soils [34–36*] (Table 1). In particular, DIMBOA and its derivatives produced by roots of healthy maize plants were capable of altering communities of bacteria of the rhizosphere. Maize plants growing in soil where microbial communities were previously conditioned by maize plants producing DIMBOA, showed significant induction of defense marker genes, defense hormones (SA and JA) and a reduction of caterpillar weight after feeding [35**]. These changes were not observed when using maize mutants that do not produce DIMBOA, providing a clear demonstration that DIMBOA biosynthesis was required for such plant-soil feedbacks.

Similarly, attacked plants can modify the leaf or soil microbiome in such a way that the next coming plants will display greater immunity [37*]. Plants of *A. thaliana* infected by pathogenic bacteria produced root exudates altering microbiome composition that in turn induced an increase of JA in the leaves that prevented further pathogen infections [38]. Another recent study demonstrated that downy mildew-infected *A. thaliana* plants conditioned the soil for resistance-inducing activity, providing protection against this pathogen in consecutive sowings [39]. Such legacies may have strong implications in the processes selecting genotypes across generations, and should be taken into account when studying to process of niche construction [40–42] (Box 1).

Signaling danger between plants: a neighborhood watch

In situations of biotic stress, plants release a cocktail of compounds above and belowground, such as VOCs, root exudates, or small peptides. Neighboring plants can detect these signals and activate their own defense system to be protected in case of future attacks [43]. This phenomenon is called eavesdropping [44] and is well known in response to insects, where VOCs are involved [9,20,45].

Recent findings demonstrate that eavesdropping is not limited to defense against insects but also occurs on pathogen attack (Table 1). Indeed, systemic acquired resistance (SAR), a defense priming mechanism initially discovered between infected and uninfected tissues within the same plant [46], was observed between neighboring plants [47,48]. Volatile monoterpenes emitted from bacterial-infected leaves moved to distant leaves of the same plant (within-plant SAR) but also to leaves of neighboring plants, and activated an SA-associated immunity (between-plant SAR) through classical SAR signaling *LLP1* and *AZI1* genes. The activation of theses specific genes also drove a positive feedback loop stimulating monoterpene biosynthesis and emission, potentially promoting the generation of a wave of plant-derived volatile defense signals moving

between leaves of neighboring plants [48**]. In another sophisticated experimental setup, signaling was evaluated between plants on which eggs (or egg extracts) were deposited and distant bacteria-infected plants [49**]. An uncharacterized soil-born signal from plants stimulated by eggs diffused up to 6 cm away to neighbor plants where it triggered an increase of bacterial resistance in leaf tissues. While this phenomenon enhanced SA production in the receiver plant, it did not require a functional production of SA in the sender plant.

Quite surprisingly, plants can also detect signals of danger from heterospecific neighbors that boost their defense [50*]. For example, cis-3-hexenyl acetate, an herbivore-induced plant volatile released from most plants, has been shown to prime defense in numerous plants, to reduce herbivory in lima bean [51], and to increase wheat resistance against the head blight fungal pathogen *Fusarium graminearum* [52]. Similarly, soybean plants exposed to volatiles from wounded-cut goldenrods showed less damage upon herbivory attack by *Spodoptera litura* larvae, in the field and in laboratory conditions [53**]. Such interspecific eavesdropping may protect different plant species within a community from generalist herbivores.

Ecological and agronomical relevance

In the field of community ecology, the competition for resources is a *usual suspect* for explaining the outcome of plant–plant interactions [54]. Inversely, exchange of signals between plants could lead to the emergence of cooperation [55–57] and altruistic behavior [58]. From such ecological perspective, it is noteworthy that with a few exceptions [14,15,59], most plant–plant interactions reviewed here have positive effects on plant immunity or biotic stress resistance (Figure 1; Table 1). Including pathogens back to the (ecological) game could help solving a long-term paradox coming from opposing predictions between ecological and evolutionary theories (niche and kin selection theories, respectively [60–62]). Indeed, while close relatives should compete more for the same resources (niche theory), leading to competitive exclusion, recognizing and collaborating with relatives is crucial for organisms living together to reduce competition among them (kin selection theory). In that respect, the fitness loss due to competition could be counter-balanced by the benefits due to enhanced resistance provided by increased immunity.

Resistance to pests and pathogens is also crucial in an agricultural context. Using species or genotypic mixtures at the field level is a well-known way to reduce pathogen propagation [63–67] through inoculum dilution in particular [70,71]. Because inoculum dilution is only efficient when inoculum comes from within the field, the reviewed evidences that one plant may induce immunity in neighboring plants are very promising because it may provide resistance to inoculum from outside the field. Again, the biological processes mediating this phenomenon are urgent to understand because they could be further mobilized in the design of intercropping systems [72,73] and varietal mixtures [74] (Box 1).

Conclusions

The recent studies reporting the effect of plant–plant interactions on immunity and resistance indicate that this phenomenon is widespread. It involves several biological processes and many questions remain to be answered (Box 1). Besides the genes and molecules underlying these processes to be discovered, the proposed framework (Figure 1) has broad ecological and agronomical consequences and may help our efforts to understand of how community are built in natural ecosystems and how we can built plant assemblages in crop fields that better resist to pests and pathogens.

Funding

This work was supported by an ANR grant (AMUSER project) and RP is supported by a PhD grant from Institut Agro. CV was supported by the European Research Council (ERC) Starting Grant Project 'ecophysiological and biophysical constraints on domestication in crop plants (grant ERC-StG-2014-639706-CONSTRAINTS).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this article.

Acknowledgments

The authors thank Mahault M. for her help on designing Figure 1 and other members of our teams for fruitful discussions.

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

* of special interest
** of outstanding interest

1. Jones JDG, Dangl JL: **The plant immune system**. *Nature* 2006, **444**:323.

2. Scheres B, van der Putten WH: **The plant perceptron connects environment to development**. *Nature* 2017, **543**:337–345.

3. Nobori T, Tsuda K: **The plant immune system in heterogeneous environments**. *Curr Opin Plant Biol* 2019, **50**:58–66.

4. Vannier N, Agler M, Hacquard S: **Microbiota-mediated disease resistance in plants**. *PLoS Pathog* 2019, **15**, e1007740.

5. * Subrahmaniam HJ, Libourel C, Journet E-P, Morel J-B, Muños S, Niebel A, Raffaele S, Roux F: **The genetics underlying natural variation of plant–plant interactions, a beloved but forgotten member of the family of biotic interactions**. *Plant J* 2018, **93**: 747–770.
This review summarizes and compares 16 transcriptomic studies focusing on the impact of plant–plant interactions. The study

provides an important amount of information about neighbor detection and transcriptomic response strategies, by identifying QTL and gene including pathogen related gene involved in plant–plant interactions.

6. Rahman MK u, Zhou X, Wu F: **The role of root exudates, CMNs, and VOCs in plant–plant interaction**. *J Plant Interact* 2019, **14**: 630–636.

7. Wang N-Q, Kong C-H, Wang P, Meiners SJ: **Root exudate signals in plant–plant interactions**. *Plant Cell Environ* 2021, **44**: 1044–1058.

8. Stenberg JA: **A conceptual framework for integrated pest management**. *Trends Plant Sci* 2017, **22**:759–769.

9. Ninkovic V, Markovic D, Rensing M: **Plant volatiles as cues and signals in plant communication**. *Plant Cell Environ* 2020, https://doi.org/10.1111/pce.13910.

10. Moreira X, Abdala-Roberts L: **Specificity and context-dependency of plant–plant communication in response to insect herbivory**. *Curr Opin Insect Sci* 2019, **32**:15–21.

11. Zhu S, Morel J-B: **Molecular mechanisms underlying microbial disease control in intercropping**. *Mol Plant Microbe Interact* 2019, https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0058-CR.

12. Pierik R, Mommer L, Voesenek LA: **Molecular mechanisms of plant competition: neighbour detection and response strategies**. *Funct Ecol* 2013, **27**:841–853.

13. Ballaré CL, Pierik R: **The shade-avoidance syndrome: multiple signals and ecological consequences: neighbour detection and shade avoidance**. *Plant Cell Environ* 2017, **40**:2530–2543.

14. Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, de Wit M, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CMJ, Ballaré CL: **Low red/far-red ratios reduce Arabidopsis resistance to botrytis cinerea and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent Mechanism1[C][W][OA]**. *Plant Physiol* 2012, **158**:2042–2052.

15. Wit M de, Spoel SH, Sanchez-Perez GF, Gommers CMM, Pieterse CMJ, Voesenek LACJ, Pierik R: **Perception of low red: far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in Arabidopsis**. *Plant J* 2013, **75**:90–103.

16. Chen BJW, Hajiboland R, Bahrami-Rad S, Moradtalab N, Anten NPR: **Presence of belowground neighbors activates defense pathways at the expense of growth in tobacco plants**. *Front Plant Sci* 2019, **10**.

17. Zheng M, Chen J, Shi Y, Li Y, Yin Y, Yang D, Luo Y, Pang D, Xu X, Li W, *et al.*: **Manipulation of lignin metabolism by plant densities and its relationship with lodging resistance in wheat**. *Sci Rep* 2017, **7**:41805.

18. Kula AAR, Hey MH, Couture JJ, Townsend PA, Dalgleish HJ: **Intraspecific competition reduces plant size and quality and damage severity increases defense responses in the herbaceous perennial, Asclepias syriaca**. *Plant Ecol* 2020, **221**: 421–430.

19. Anten N, Chen B: *Detect thy family: mechanisms, ecology and agricultural aspects of kin recognition in plants*. 2020. Preprints.

20. Karban R, Shiojiri K, Ishizaki S, Wetzel WC, Evans RY: **Kin recognition affects plant communication and defence**. *Proc R Soc B Biol Sci* 2013, **280**:20123062.

21. * Biedrzycki Ml LV, Bais HP: **Transcriptome analysis of Arabidopsis thaliana plants in response to kin and stranger recognition**. *Plant Signal Behav* 2011, **6**:1515–1524.
This article is to our knowledge the only article showing that in *A.thaliana*, intraspecific plant–plant interaction with kins mediated by root exudates can induce the expression of immunity. By using RT-QPCR, the authors show that an increased expression of SA and JA-related genes involved in defense response against pathogen correlated with genetic distance of the root exudate applied

22. * Sukegawa S, Shiojiri K, Higami T, Suzuki S, Arimura G: **Pest management using mint volatiles to elicit resistance in soy: mechanism and application potential**. *Plant J* 2018, **96**: 910–920.
This research article shows that constitutive VOCs elicitated from unchallenged mint plants can activate several defense genes and reduce herbivory in the field in two different species of plants, *Glycine max* and *Brassica rapa*. Moreover, the authors go further on the understanding of the mechanism by demonstrating that VOCs from mint directly affect histone acetylation of the promoter of defense genes, resulting in enhanced immunity.

23. Blum U: **Reflections regarding plant-plant interactions, communications and allelopathic interactions with an emphasis on allelopathic interactions**. In *Plant-plant allelopathic interactions III*. Springer International Publishing; 2019:1–26.

24. Kong C-H, Xuan TD, Khanh TD, Tran H-D, Trung NT: **Allelochemicals and signaling chemicals in plants**. *Molecules* 2019, **24**:2737.

25. * Kong C-H, Zhang S-Z, Li Y-H, Xia Z-C, Yang X-F, Meiners SJ, Wang P: **Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals**. *Nat Commun* 2018, **9**:3867.
This study shows that the production of an allelochemical compound (diMBOA) implicated in wheat defense against herbivory and soil pathogen is determined by the type of neighbor and the allelochemical produced by the neighbor. This important result highlights the fact that the production of defense molecules can be specifically modulated by other allelochemical compounds.

26. Niculaes C, Abramov A, Hannemann L, Frey M: **Plant protection by benzoxazinoids—recent insights into biosynthesis and function**. *Agronomy* 2018, **8**:143.

27. Cheng F, Cheng Z-H, Meng H-W: **Transcriptomic insights into the allelopathic effects of the garlic allelochemical diallyl disulfide on tomato roots**. *Sci Rep* 2016, **6**:38902.

28. ** Venturelli S, Belz RG, Kämper A, Berger A, Horn K von, Wegner A, Böcker A, Zabulon G, Langenecker T, Kohlbacher O, *et al.*: **Plants release precursors of histone deacetylase inhibitors to suppress growth of competitors**. *Plant Cell* 2015, https://doi.org/10.1105/tpc.15.00585.
This work focused on the effects of the benzoxaninoid DIMBOA on the roots of *A.thaliana*. By interacting with histone desacetylase, the derivatives of DIMBOA regulate transcriptional activities of genes, including defense genes. This provides a detailed mechanism by which heterospecific allelochemicals can modify gene expression.

29. Yang X-F, Li L-L, Xu Y, Kong C-H: **Kin recognition in rice (Oryza sativa) lines**. *New Phytol* 2018, **220**:567–578.

30. Takagi H, Ishiga Y, Watanabe S, Konishi T, Akiyoshi N, Matsuura T, Mori IC, Hirayama T, Kaminaka H, Shimada H, *et al.*: *Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner*. 2016.

31. Li L-L, Zhao H-H, Kong C-H: **(−)-Loliolide, the most ubiquitous lactone, is involved in barnyardgrass-induced rice allelopathy**. *J Exp Bot* 2020, **71**:1540–1550.

32. Murata M, Nakai Y, Kawazu K, Ishizaka M, Kajiwara H, Abe H, Takeuchi K, Ichinose Y, Mitsuhara I, Mochizuki A, *et al.*: **Loliolide, a carotenoid metabolite, is a potential endogenous inducer of herbivore resistance**. *Plant Physiol* 2019, **179**:1822–1833.

33. Bennett JA, Klironomos J: **Mechanisms of plant–soil feedback: interactions among biotic and abiotic drivers**. *New Phytol* 2019, **222**:91–96.

34. Ma H-K, Pineda A, van der Wurff AWG, Raaijmakers C, Bezemer TM: **Plant–soil feedback effects on growth, defense and susceptibility to a soil-borne disease in a cut flower crop: species and functional group effects**. *Front Plant Sci* 2017, **8**.

35. ** Hu L, Robert CAM, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Manzo D, Chervet N, Steinger T, van der Heijden MGA, *et al.*: **Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota**. *Nat Commun* 2018, **9**:1–13.
This study shows how benzoxaninoid, a secondary metabolite produced by numerous Poaceae, can influence plant physiology, including defense and immunity. By shaping the composition of root associated microbiota, DIMBOA and its derivative can influence the expression of defense genes, the level of phytohormones like SA and JA and herbivory incidence on the next growing generation.

36. * Wang M, Ruan W, Kostenko O, Carvalho S, Hannula SE, Mulder PPJ, Bu F, Putten WH van der, Bezemer TM: **Removal of soil biota alters soil feedback effects on plant growth and defense chemistry**. *New Phytol* 2019, **221**:1478–1491.
This study reports on the implication of different components of the macro- and meso-fauna in the Plant Soil Feedback phenomenon. By selectively removing bacteria and fungi in soil conditionned by plants exposed to belowground or aboveground herbivory attack, they show that Plant soil Feedback effects depend on the type of micro-organism and herbivory.

37. ** Rolfe SA, Griffiths J, Ton J: **Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes**. *Curr Opin Microbiol* 2019, **49**:73–82.
This recent review highlights the mechanisms and provides steps by which plants are able to generate plant soil feedbacks in case of attack to protect next-generation offsprings with the recruitment of specific microbiota.

38. Yuan J, Zhao J, Wen T, Zhao M, Li R, Goossens P, Huang Q, Bai Y, Vivanco JM, Kowalchuk GA, *et al.*: **Root exudates drive the soil-borne legacy of aboveground pathogen infection**. *Microbiome* 2018, **6**:156.

39. ** Berendsen RL, Vismans G, Yu K, Song Y, de Jonge R, Burgman WP, Burmølle M, Herschend J, Bakker PAHM, Pieterse CMJ: **Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium**. *ISME J* 2018, **12**:1496–1507.
This study shows how *A. thaliana* promotes three different species of bacteria in its rizosphere when inoculated by the downy mildew pathogen. Interestingly, separately, these bacteria do not affect defense while together they form a biofilm which is able to induce resistance in the next growing generation.

40. Whitham TG, Young WP, Martinsen GD, Gehring CA, Schweitzer JA, Shuster SM, Wimp GM, Fischer DG, Bailey JK, Lindroth RL, *et al.*: **Community and ecosystem genetics: a consequence of the extended phenotype**. *Ecology* 2003, **84**: 559–573.

41. Whitham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, Shuster SM, Bangert RK, LeRoy CJ, Lonsdorf EV, Allan GJ, DiFazio SP, Potts BM, *et al.*: **A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems**. *Nat Rev Genet* 2006, **7**:510–523.

42. Schweitzer JA, Bailey JK, Fischer DG, LeRoy CJ, Lonsdorf EV, Whitham TG, Hart SC: **Plant-soil microorganism interactions: heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms**. *Ecology* 2008, **89**:773–781.

43. Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T: **Sensing danger: key to activating plant immunity**. *Trends Plant Sci* 2017, **22**:779–791.

44. Rebolleda-Gómez M, Wood CW: **Unclear intentions: eavesdropping in microbial and plant systems**. *Front Ecol Evol* 2019, **7**.

45. Heil M, Karban R: **Explaining evolution of plant communication by airborne signals**. *Trends Ecol Evol* 2010, **25**:137–144.

46. Shine MB, Xiao X, Kachroo P, Kachroo A: **Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens**. *Plant Sci* 2019, **279**:81–86.

47. Riedlmeier M, Ghirardo A, Wenig M, Knappe C, Koch K, Georgii E, Dey S, Parker JE, Schnitzler J-P, Vlot AC: **Monoterpenes support systemic acquired resistance within and between plants**. *Plant Cell* 2017, **29**:1440–1459.

48. ** Wenig M, Ghirardo A, Sales JH, Pabst ES, Breitenbach HH, Antritter F, Weber B, Lange B, Lenk M, Cameron RK, *et al.*: **Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues**. *Nat Commun* 2019, **10**.
This research article shows by multiple series of experiences how VOCs transmission in *A. thaliana* activate SAR from plant to plant. Through monoterpenes, neighbor plants are able to increase SA-related immunity in the focal plant, and to trigger the production of monoterpenes which potentially propagate waves of defense signaling in the all plant neighborhood.

49. ** Orlovskis Z, Reymond P: ***Pieris brassicae* eggs trigger inter-plant systemic acquired resistance against a foliar pathogen in Arabidopsis**. *New Phytol* 2020, **228**:1652–1661.
This article demonstrates that SAR can be transmitted in the soil by an unknown signal between plants. Moreover, it shows that a stimulus such as egg deposition can be effective to induce pathogen resistance in the neighboring plant.

50. * Meents AK, Mithöfer A: **Plant–plant communication: is there a role for volatile damage-associated molecular Patterns?** *Front Plant Sci* 2020:11.
This recent review summarizes examples of interaction between plant where Damage-Associated Molecular Patterns such as HIPV are associated with physiological change in the neighboring plant such as defense.

51. Freundlich GE, Frost CJ: **Variable costs and benefits of eavesdropping a green leaf volatile on two plant species in a common garden**. *bioRxiv* 2019, https://doi.org/10.1101/370692.

52. Ameye M, Audenaert K, De Zutter N, Steppe K, Van Meulebroek L, Vanhaecke L, De Vleesschauwer D, Haesaert G, Smagghe G: **Priming of wheat with the green leaf volatile *Z*-3-Hexenyl acetate enhances defense against *Fusarium graminearum* but boosts deoxynivalenol production**. *Plant Physiol* 2015, **167**:1671–1684.

53. ** Shiojiri K, Ozawa R, Yamashita K-I, Uefune M, Matsui K, Tsukamoto C, Tokumaru S, Takabayashi J: **Weeding volatiles reduce leaf and seed damage to field-grown soybeans and increase seed isoflavones**. *Sci Rep* 2017, **7**:41508.
This study deals about the effect of VOCs produced by cut goldenrods on soybean. VOCs emitted after cutting were able to increase defense against herbivory both in the lab and in the field. Moreover, this example of eavesdropping also triggered an accumulation of isoflavones in the seeds of the exposed soybean, resulting in reducing herbivory and pathogen attack in the future generation, suggesting that the effect of eavesdropping can persist generation after generation.

54. Tilman D: *Resource competition and community structure*. Princeton University Press; 1982.

55. Murphy GP, Dudley SA: **Kin recognition: competition and cooperation in *impatiens* (balsaminaceae)**. *Am J Bot* 2009, **96**: 1990–1996.

56. Dudley SA, Murphy GP, File AL: **Kin recognition and competition in plants**. *Funct Ecol* 2013, **27**:898–906.

57. Ehlers BK, Damgaard CF, Laroche F: **Intraspecific genetic variation and species coexistence in plant communities**. *Biol Lett* 2016, **12**:20150853.

58. Anten NPR, Vermeulen PJ: **Tragedies and crops: understanding natural selection to improve cropping systems**. *Trends Ecol Evol* 2016, **31**:429–439.

59. Huang W, Gfeller V, Erb M: **Root volatiles in plant–plant interactions II: root volatiles alter root chemistry and plant–herbivore interactions of neighbouring plants**. *Plant Cell Environ* 2019, **42**:1964–1973.

60. Griffin AS, West SA: **Kin selection: fact and fiction**. *Trends Ecol Evol* 2002, **17**:15–21.

61. Silvertown J: **Plant coexistence and the niche**. *Trends Ecol Evol* 2004, **19**:605–611.

62. Levine JM, HilleRisLambers J: **The importance of niches for the maintenance of species diversity**. *Nature* 2009, **461**:254–257.

63. Finckh MR, Gacek ES, Goyeau H, Lannou C, Merz U, Mundt CC, Munk L, Nadziak J, Newton AC, Vallavieille-Pope C de, *et al.*: **Cereal variety and species mixtures in practice, with emphasis on disease resistance**. *Agronomie* 2000, **20**: 813–837.

64. Smithson JB, Lenné JM: **Varietal mixtures: a viable strategy for sustainable productivity in subsistence agriculture**. *Ann Appl Biol* 1996, **128**:127–158.

65. Tooker JF, Frank SD: **Genotypically diverse cultivar mixtures for insect pest management and increased crop yields**. *J Appl Ecol* 2012, **49**:974–985.

66. Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Li Y, Chen J, Fan J, Yang S, Hu L, Leung H, *et al.*: **Genetic diversity and disease control in rice**. *Nature* 2000, **406**:718–722.

67. Wolfe MS: **Yield stability in barley using varietal mixtures and disease control**. *Cereal Res Commun* 1977, **5**:119–124.

70. Keesing F, Ostfeld RS: **Is biodiversity good for your health?** *Science* 2015, **349**:235–236.

71. Mundt CC: **Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management**. *Annu Rev Phytopathol* 2002, **40**: 381–410.

72. Bybee-Finley KA, Ryan MR: **Advancing intercropping research and practices in industrialized agricultural landscapes**. *Agriculture* 2018, **8**:80.

73. Li L, Tilman D, Lambers H, Zhang F-S: **Plant diversity and overyielding: insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture**. *New Phytol* 2014, **203**:63–69.

74. Barot S, Allard V, Cantarel A, Enjalbert J, Gauffreteau A, Goldringer I, Lata J-C, Le Roux X, Niboyet A, Porcher E: **Designing mixtures of varieties for multifunctional agriculture with the help of ecology. A review**. *Agron Sustain Dev* 2017, **37**:13.

75. Coppola M, Cascone P, Madonna V, Di Lelio I, Esposito F, Avitabile C, Romanelli A, Guerrieri E, Vitiello A, Pennacchio F, *et al.*: **Plant-to-plant communication triggered by systemin primes anti-herbivore resistance in tomato**. *Sci Rep* 2017, **7**: 15522.

76. * Markovic D, Colzi I, Taiti C, Ray S, Scalone R, Gregory Ali J, Mancuso S, Ninkovic V: **Airborne signals synchronize the defenses of neighboring plants in response to touch**. *J Exp Bot* 2019, **70**:691–700.
This original research focuses on the effect of a touch on the emission of VOCs from maize. Interestingly VOCs emitted from touched plant can activate defense in neighboring plant, suggesting that touch from multiple stimulus (plant density, wind, animal, rain …) can induce eavesdropping similarly to pathogen or herbivory attack.

IV.3. Résultats préliminaires

Avant mon arrivée dans l'équipe, des résultats préliminaires indiquaient que la sensibilité aux agents pathogènes pouvait être modifiée par les interactions plante-plante chez le riz et le blé.

ENCADRÉ 1. Terminologie Plante focale, voisin et voisinage

Dans un mélange binaire de deux variétés ou génotypes de la même espèce, la plante focale est définie comme celle sur laquelle les effets du système sont regardés. La plante voisine est celle qui provoque un effet dans son voisinage (la plante focale). Une plante focale peut donc être considérée comme une voisine, et inversement, selon l'angle que l'on considère.

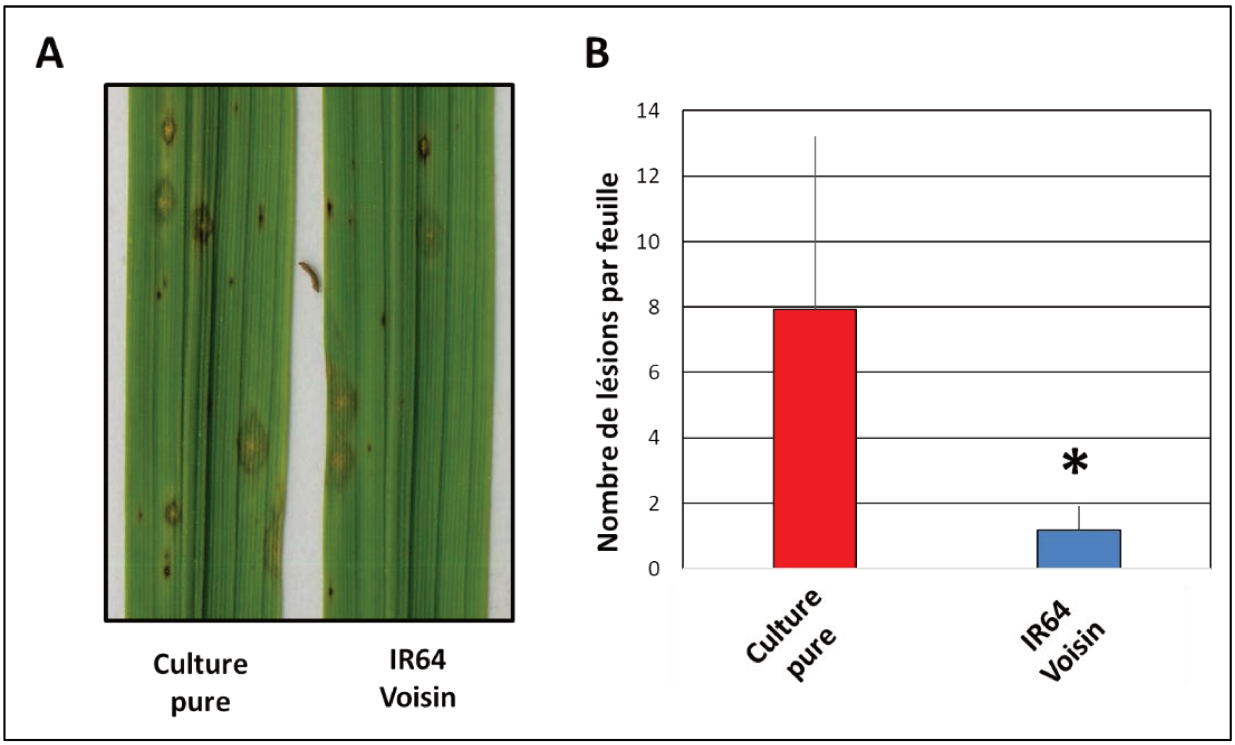


Figure 9. Résultats préliminaires montrant une modification de la sensibilité de la variété Nipponbare à *M. oryzae* en fonction de son voisinage végétal

A) Phénotype pathologique des feuilles de la variété Nipponbare en condition de culture pure ou en présence de IR64. Les lésions montrant un centre blanchâtre sont indicatrices de sensibilité. Les lésions marron dénotent une réaction de résistance. La somme de ces deux types de lésions est souvent utilisée comme mesure de la sensibilité.

B) Quantification du nombre de lésions produites par la souche *Guy11* de *M. oryzae* sur les feuilles de la variété Nipponbare. L'histogramme montre le nombre moyen de lésions par feuille obtenu sur 16 feuilles de Nipponbare provenant de 4 pots. L'étoile indique une différence significative déterminée par un test de Student (t-test $p < 0,05$)

La première donnée préliminaire montrait que dans des mélanges binaires, la sensibilité de la plante focale (voir encadré 1 pour la terminologie) pouvait être réduite par son voisin (**Figure.9)**. Cette réduction de sensibilité était associée à une augmentation de l'expression de certains gènes de défense, une observation cohérente avec le fait que l'expression des gènes de l'immunité chez le riz corrèle avec le niveau de résistance à *Magnaporthe oryzae* (Vergne *et al.*, 2010; Grand *et al.*, 2012).

ENCADRÉ 2. Terminologie immunité, défense, sensibilité et résistance

L'immunité ou la défense sont ici entendues comme l'ensemble des processus moléculaires faisant partie du système immunitaire des plantes (Jones & Dangl, 2006). Le terme de sensibilité (ou niveau de sensibilité) est utilisé comme un terme quantitatif qui représente la quantité de symptômes sur une plante soumise à un agent pathogène. Chez le riz, l'expression constitutive des gènes de l'immunité (ou de défense) corrèle avec le niveau de sensibilité à *Magnaporthe oryzae* (Vergne et al., 2010). Le terme de résistance est ici entendu au sens du phénotype d'une plante ne montrant pas ou peu de symptômes, sans *a priori* sur les mécanismes sous-jacents.

Des résultats similaires existaient chez le blé dur, où des mélanges avait été effectués en condition contrôlées pour plusieurs génotypes dans le cadre d'un stage de master 2 effectué par Coline Temple. L'analyse de ces résultats avait permis d'identifier plusieurs couples où la résistance contre la rouille brune (*Puccina triticina*) était modifiée.

Par commodité, nous proposons d'utiliser le terme de NMS «Neighbour-Modulated Susceptibility» pour décrire les changements de sensibilité provoqués par une plante voisine sur une plante focale.

ENCADRÉ 3. Projet AMUSER

Le projet AMUSER cherche à tester la façon dont des **mélanges de riz** sont plus productifs et/ou plus résistants aux agents pathogènes lorsque les génotypes qui les composent sont plus ou moins complémentaires pour l'utilisation des ressources et ont la capacité d'émettre des signaux déclencheurs de l'immunité d'autrui. Ce projet rassemble des unités de **MUSE** (Montpellier Université d'Excellence) dont le **CEFE** (CNRS), **PHIM** et **AGAP**. Il s'inscrit aussi dans le cadre d'un partenariat avec le Centre Français du Riz (CFR), l'Université de Californie Davis (Etats-Unis) et l'Université de Yunnan (Chine). Ce projet soulève des questions qui font appel à des concepts et théories de l'**écologie** (complémentarité de niches), de l'**évolution** (sélection de parentèle), de la **génétique** (génétique des interactions plantes-plantes), de la **biologie végétale** (génétique de la résistance), de l'écologie fonctionnelle (stratégie et compromis fonctionnelle), et de l'**écophysiologie** (demande carbonée, exsudation racinaire). De plus, il explore également plus généralement la pertinence d'appliquer des « solutions qui s'appuient sur la nature » à l'agronomie à la fois dans le contexte de l'**agroécologie** et de la **domestication**.

V.Objectifs de la thèse

V.1. Question centrale du projet et modèles biologiques

Ma thèse s'inscrit dans le cadre du projet AMUSER (**ENCADRÉ 3**) et s'articule autour d'une question principale qui est : la sensibilité des plantes peut-elle être modulée par son voisinage lors de la culture en mélange ? Si oui, quels sont les mécanismes derrière cette modulation ?

A travers cette étude nous tenterons d'apporter des informations sur:

- L'ampleur, la fréquence et le sens des modifications de sensibilité induites par le voisinage dans les mélange variétaux ;
- La part relative des modifications induites par les interactions plante-plante et celles de la sensibilité intrinsèque des génotypes ;
- L'importance des composés allélochimiques dans les interactions plante-plante et leur impact sur les régulations hormonales et immunitaires des plantes ;
- L'implication du compartiment aérien ou souterrain et de leurs composants respectifs dans les interactions plante-plante ;
- Le lien entre distance génétique entre les génotypes d'un mélange et la modification de sensibilité induite par leur interaction.

Les modèles biologiques choisis pour répondre à ces questions sont des modèles agronomiques pour permettre de futurs essais aux champs : le riz et le blé dur. Les agents pathogènes choisis sont, pour le riz : *Magnaporte oryzae* et *Bipolaris oryzae* et pour le blé *P. triticina* et *Z. tritici*. Il s'agit d'agents pathogènes foliaires, d'importance agronomique et présentant des modes de vie contrastés permettant *a priori* de révéler des réponses différentielles aux différentes voies métaboliques du système immunitaire.

V.2. Questions spécifiques, hypothèses et démarches effectuées

Après l'analyse de la bibliographie et des résultats préliminaires à notre disposition, nous avons retenu 3 grandes questions résumées ci-dessous et développées dans les 3 chapitres suivants. Chaque chapitre est à l'origine d'un article de recherche, publié ou en cours de publication.

Quelle ampleur et contribution des interactions plantes – plantes intra-spécifiques à la sensibilité, chez le riz et le blé dur ?

Nous faisons l'hypothèse que les interactions plante-plante peuvent moduler la sensibilité et voulons évaluer l'ampleur, la fréquence et le sens (sensibilité réduite ou sensibilité accrue) de ce phénomène dans deux espèces de céréales. Différents éléments indiquent que la réponse des plantes aux interactions plante-plante pourrait être liées à la distance génétique entre les plantes. Par ailleurs, nous avons voulu estimer la part de sensibilité conférée par les génotypes eux-mêmes et les interactions plante-plante.

Cette question a été explorée en réalisant des expériences de phénotypage pathologique sur 4 matrices d'interactions plante-plante issues de 4 populations de riz et de blé (Riz : Japonica tempérée cultivés et lignées Indica Acuce ; Blé : Variétés élites cultivés et lignées EPO). Les modulations de sensibilité ont été analysées par rapport à la distance génétique entre les différents voisins. De plus un modèle DGE x IGE (Direct Genotype Effect x Indirect Genotype Effect) a été utilisé afin d'estimer la part des effets « focale » et des effets « voisin » dans la NMS. Les expériences sur blé dur ont été réalisées par Luis Buendia (Post doctorant) et Coline Temple (Etudiante de Master).

Ce travail fait l'objet d'un article qui sera prochainement soumis à la série **Nature** ou **PNAS**

La modulation de sensibilité à un agent pathogène est-elle liée à un signal échangé dans le sol entre plantes voisines et résulte-t'elle de changement de l'expression de l'immunité?

Ici nous testons l'hypothèse que les interactions plante-plante peuvent être fonction de signaux échangés dans le sol. Puisque l'expression de certains gènes de défense peut affecter différemment la sensibilité à différents agents pathogènes, nous examinons l'expression de l'immunité dans les mélanges et leur relation avec la sensibilité à des agents pathogènes aux modes trophiques différents

Ces questions ont été posées en parallèle dans les cas d'un mélange de 2 variétés de riz et d'un mélange de 2 variétés de blé dur présentant un phénotype de NMS fort. Des expériences d'inoculation avec différents agents pathogènes, de séparation de sol et d'air ainsi que des expériences d'analyses de l'expression de certains gènes de défense ont été effectuées. Les expériences sur blé dur ont été réalisées par Luis Buendia (Post doctorant) et Coline Temple (Etudiante de Master).

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans **Journal of Experimental Botany**.

Le déclenchement de la NMS est-il dû à un ou différents signaux produits par le voisin et sont-ils génétiquement identifiables ? L'impact de ces signaux sur la plante focale pourrait-il impliquer d'autres voies métaboliques que l'immunité?

Etant donné le rôle des métabolites secondaires dans les interactions plante-plante, nous faisons l'hypothèse qu'ils pourraient être impliqués dans le déclenchement de la NMS. Cependant plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine du déclenchement de la NMS et une analyse génétique pourrait les identifier sans *a priori*. Au-delà de modifications de l'immunité, la NMS pourrait déclencher dans une plante focale d'autres processus transcriptionnellement régulés, par exemples des modifications du métabolisme primaire qui pourraient avoir un impact sur l'agressivité des agents pathogènes.

La première hypothèse a été explorée au travers d'une analyse du contrôle génétique et moléculaire de la NMS dans le modèle riz japonica tempéré/pyriculariose. Cette partie comprend des expériences de génétique d'association (GWAS) sur les réponses de sensibilité de la plante focale (Kitaake) co-cultivée avec 280 voisins intra-spécifiques. La deuxième hypothèse a été testée par une analyse transcriptomique visant à explorer les mécanismes impliqués dans les réponses de la plante Kitaake à des voisins identifiés comme augmentant la sensibilité, la réduisant ou n'ayant pas d'effet sur celle-ci.

Ce travail fait l'objet d'un article qui sera soumis au journal **New Phytologist.**

Chapitre 1

Plant-plant interactions are critical to pathogen resistance in cereal mixtures

Pélissier Rémi, Temple Coline, Ducasse Aurélie, Brousse Andy, Ballini Elsa, Colombo Michel, Frouin Julien, Qin Xiaoping, Huang Huichuan, Fréville Hélène, David Jacques, Fort Florian, Violle Cyrille, Jean-Benoit Morel

Article de recherche en préparation pour le journal Nature ou PNAS

I.Présentation générale

Dans ce chapitre, nous testons l'hypothèse centrale du projet de thèse en examinant si la sensibilité des plantes aux agents pathogènes peut être modifiée par le voisinage intra-spécifique dans deux espèces : le riz et le blé dur.

Dans l'optique de fournir des résultats à portée générale, nous décidons de réaliser ces expériences dans des jeux de génotypes avec des historiques de sélection différents dans chaque espèce. Pour le riz, nous avons ainsi sélectionné un premier jeu de 12 génotypes de riz japonica tempérés cultivés en Europe. Comme deuxième sous-ensemble, 10 génotypes représentatifs ont été sélectionnés dans une variété population traditionnelle de riz indica, Acuce, cultivée à par des agriculteurs dans les terrasses du Yunnan en Chine. Pour le blé, nous avons sélectionné un jeu de 10 génotypes de blé dur européens cultivés. En second ensemble, nous avons utilisé 10 génotypes de blé dur issus d'une population destinée à maximiser la diversité génétique (EPO).

Afin de tester notre hypothèse principale, nous réalisons tous les mélanges binaires (composés de deux génotypes) possibles dans chacun des jeux de génotypes, dans des pots, en conditions contrôlées. Ces pots sont inoculés avec l'agent pathogène *M. oryzae* pour les mélanges de riz et *P. triticina* pour le blé. La sensibilité de chaque génotype est par la suite mesurée en condition pure (cultivé en présence du même génotype) et en présence des 9 ou 11 autres voisins intra-spécifiques possibles.

Dans le but d'observer si la culture en mélange impacte la sensibilité globale du système, nous comparons dans un premier temps la sensibilité moyenne observée de chaque mélange à la prédiction de sa sensibilité théorique basée sur la sensibilité des composants purs du mélange. Ces données sont aussi utilisées pour tester l'hypothèse d'un lien entre la distance génétique entre les deux génotypes d'un mélange et le niveau de la modification de sensibilité observée.

A l'aide d'un modèle statistique IGE:DGE, nous mesurons la part de sensibilité conférée par le génotype lui-même à la part conférée par les interactions plante-plante. Par la suite, nous nous intéressons plus particulièrement aux facteurs pouvant déterminer les modifications de sensibilité par les interactions plante-plante. Pour ce faire, nous tentons de savoir si certains génotypes sont plus enclins à modifier la sensibilité de leur voisin, à voir leur sensibilité impactée par le voisinage ou au contraire si les modifications observées résultent seulement de l'interaction spécifique entre deux génotype et que aucun effet général ne peut être observé.

II. Article de recherche: *Plant-plant interactions are critical to pathogen susceptibility in cereal mixtures*

Pélissier Rémi[1], Temple Coline[3], Ducasse Aurélie[3], Ballini Elsa[1], Colombo Michel[6], Frouin Julien[6], Qin Xiaoping[7], Huang Huichuan[7], Fréville Hélène[6], David Jacques[6], Fort Florian[4], Violle Cyrille[5], Jean-Benoit Morel[3]¥

Author affiliations and institutions address:

1: PHIM, Institut Agro, INRAE, CIRAD, Univ Montpellier, Montpellier, France.

2: PHIM, Univ Montpellier, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Montpellier, France.

3: PHIM, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Univ Montpellier, Montpellier, France.

4: CEFE, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Institut Agro, Montpellier, Montpellier, France

5: CEFE, CNRS, Univ Montpellier, EPHE, IRD, Montpellier, France

6: AGAP, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

7: Laboratory for Agro-biodiversity and Pest Control of Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract

Planting a crop variety with another has long been considered as a way to control epidemics at the field level. Indeed, the more diverse the fields, the higher the probability to limit pathogen dispersal (Reiss & Drinkwater, 2018; Borg *et al.*, 2018; Mundt 2002). Such a phenomenon is observable in case of ongoing epidemics only and has been shown to be highly variable or often unpredictable in the field (Borg *et al.*, 2018). This suggests that several unknown processes are involved besides the simple summoning of diversity. Scarce evidence suggests the existence of other mechanisms of modulation of plant immunity through genetic diversity in the absence of epidemics (Pélissier *et al.*, 2021b) and Neighbour-Modulated Susceptibility (NMS) resulting from direct plant-plant interactions was recently shown in rice and wheat (Pélissier *et al.*, 2021a). Thus far the modulation of susceptibility by plant-plant interactions has only been observed in a limited number of cases in intra-specific mixtures and its quantitative contribution to susceptibility at the intra-specific community level is unknown. Here, using a broad diversity of intra-specific pairs in both rice and wheat, we experimentally demonstrate significant modulation of disease susceptibility in 31 out of 402 mixtures grown in greenhouse conditions. The levels of susceptibility due to plant-plant interactions were sometimes similar to those conferred by intrinsic basal immunity. Interestingly, disease susceptibility increased or decreased, depending on neighbour identity. These findings may explain part of the high variability of disease susceptibility in cultivar mixtures. They support the notion that susceptibility reduction conferred by plant-plant interactions exist in plant intra-specific communities. Our discovery paves the way of targeting crop mixtures less susceptible to pathogens thanks to emergent properties of mixtures.

Introduction

Reducing susceptibility to plant pathogens is key to maintain low pathogen burden and to control epidemics in crop fields (Nelson *et al.*, 2018). Susceptibility can be reduced by the action of two plant intrinsic pathways: plant resistance, mostly based on resistance genes, and basal immunity (Jones & Dangl, 2006). Since resistance genes are usually not durable, in particular in monocultures (Mundt, 2014), plants are often left protected by basal immunity only which confers quantitative levels of susceptibility. The contribution of basal immunity to field susceptibility is well illustrated by the recent interest on defence inducers that are known to activate basal immunity (Sandroni, 2020). However, findings other ways to modulate basal immunity would help to reduce overall field susceptibility levels.

One way of reducing pathogen susceptibility consists in mixing varieties in the field, an old practice that is experiencing a renewed interest in Europe (Wolfe, 1985; Cowger & Mundt, 2002; Burdon *et al.*, 2014; Gaba *et al.*, 2015). For instance, septoria disease and leaf rust in wheat (Kristoffersen *et al.*, 2020) or blast fungus in rice (Zhu *et al.*, 2000; Raboin *et al.*, 2012) can be partially controlled in varietal mixtures. In varietal mixtures, adapted pathogens to one given plant genotype propagate to non-host plants to which they are not adapted, thereby leading to unsuccessful attack and inducing basal immunity that will protect plants against further infection by adapted pathogens (Mundt, 2002). Yet, meta-analyses highlight that the effects on disease susceptibility of mixing varieties are highly variable (from -40% to +40%) (Reiss & Drinkwater, 2018; Borg *et al.*, 2018). This suggests that in varietal mixtures, there are significant processes modulating susceptibility that are not understood or even identified.

Direct plant-plant interactions, in the soil or through the air, can impact plant physiology (Subrahmaniam *et al.*, 2018). On the basis of several reports, we have hypothesized that intra-specific plant-plant interactions could modulate susceptibility to diseases (Pélissier *et al.*, 2021b). We recently identified in rice and wheat grown under controlled conditions, a few cases of varietal mixtures where basal immunity and susceptibility to pathogens were modulated by healthy, intra-specific neighbour plants, a phenomenon called Neighbour-Modulated Susceptibility (NMS; (Pélissier *et al.*, 2021a)). However, the general scarcity of such varietal mixtures showing new emerging properties like NMS remains unknown.

NMS resembles other documented cases of so called Indirect Genetic Effects (IGEs), where the genotype of an individual affects the phenotype of another intra-specific, neighbouring individual (Frank, 2007; Bijma, 2014). IGE have been well-documented on size and

developmental-related traits in plants (Mutic & Wolf, 2007; Fréville *et al.*, 2019). Yet, empirical studies documenting IGEs on phenotypic traits associated with disease resistance remain sparse (Silva *et al.*, 2013). In particular, it remains to be demonstrated that NMS is truly an example of IGE. Contrary to NMS, basal immunity makes a direct quantitative contribution to susceptibility and as such represents a clear example of Direct Genetic Effect (DGE) on susceptibility. In the perspective of using NMS to modulate susceptibility in order to improve crop protection, it becomes critical to measure the relative parts played by IGE (NMS) and DGE (susceptibility measured in the absence of resistance) in disease limitation.

Some authors proposed that the intensity of response to plant-plant interactions may be dependent on the genetic distance between the individual components of the mixture (Biedrzycki *et al.*, 2010, 2011; Semchenko *et al.*, 2014). NMS provides an opportunity to test this hypothesis that would have implications for designing varietal mixtures. In addition, establishing if favourable neighbours can be found to reduce pathogen burden at the plot level would help designing varietal mixtures.

Here we measured disease susceptibility in two major cereal species, rice and durum wheat, in all possible pairs of intra-specific mixtures (402 pairs) and their corresponding 42 pure controls, using genotyped varieties. We used two major model foliar fungal pathogens of rice (*M. oryzae*) and wheat (*P. triticina*) and performed inoculations under controlled greenhouse conditions to measure disease susceptibility as a trait, in the absence of epidemics. Using an IGE:DGE model, we quantified the relevance of NMS and its relative part on susceptibility in varietal mixtures.

Results

Broad modulation of susceptibility to pathogens in varietal mixtures in the absence of epidemics

The 402 two-by-two mixtures of intra-specific genotypes grown together in pots under controlled conditions were inoculated with adapted fungal foliar pathogens and disease susceptibility was monitored before any possible pathogen dispersal. We thus produced four matrices of susceptibility levels (JAP, ACU, ELI and EPO) that were used for subsequent analyses. We created an index called RST (Relative Susceptibility Total) similar to the one used to compare yield in mixed and pure cultures in the field (see methods). RST is a measure of relative susceptibility between pure (one genotype grown with itself) and mixture (one focal genotype grown with a neighbour from a different genotype) conditions. For each of the four sets of intra-specific mixtures, the average of RST was significantly different from 1 (**Figure.1**), indicating that genotypes expressed different disease susceptibility depending on whether they were grown in mixture or pure conditions. Disease susceptibility of rice to *M. oryzae* in mixtures was increased by 4% and 12% in the JAP and ACU rice matrices respectively. On the opposite, susceptibility of wheat to *P. triticina* was reduced by 10% and 16% respectively in ELI and EPO matrices when grown in mixtures. Thus, as commonly observed in the field under pathogen dispersal, disease susceptibility is also modulated under controlled conditions, in the absence of pathogen dispersal.

We next looked at the distribution of the average susceptibility levels (see Methods) and compared the distribution between the pure and the mixture conditions (**Supplementary figure.1**). The distribution of susceptibility in rice mixtures was significantly higher in the ACU ($p = 0.003$) but not in the JAP ($p = 0.64$) matrix, suggesting positive and negative effects of plant-plant interactions. In wheat, the distribution of susceptibility in mixture condition was significantly lower in both matrices ($p= 0.009$ for ELI and $p=0.041$ for EPO), indicative of a major unilateral effect of intra-specific interactions on disease reduction.

To test whether genetic distance between the members of each mixture influenced NMS, we looked for correlation between RST and the genetic distance between the components of each pair (**Supplementary figure.2**). No significant correlation was found in any of the four populations tested.

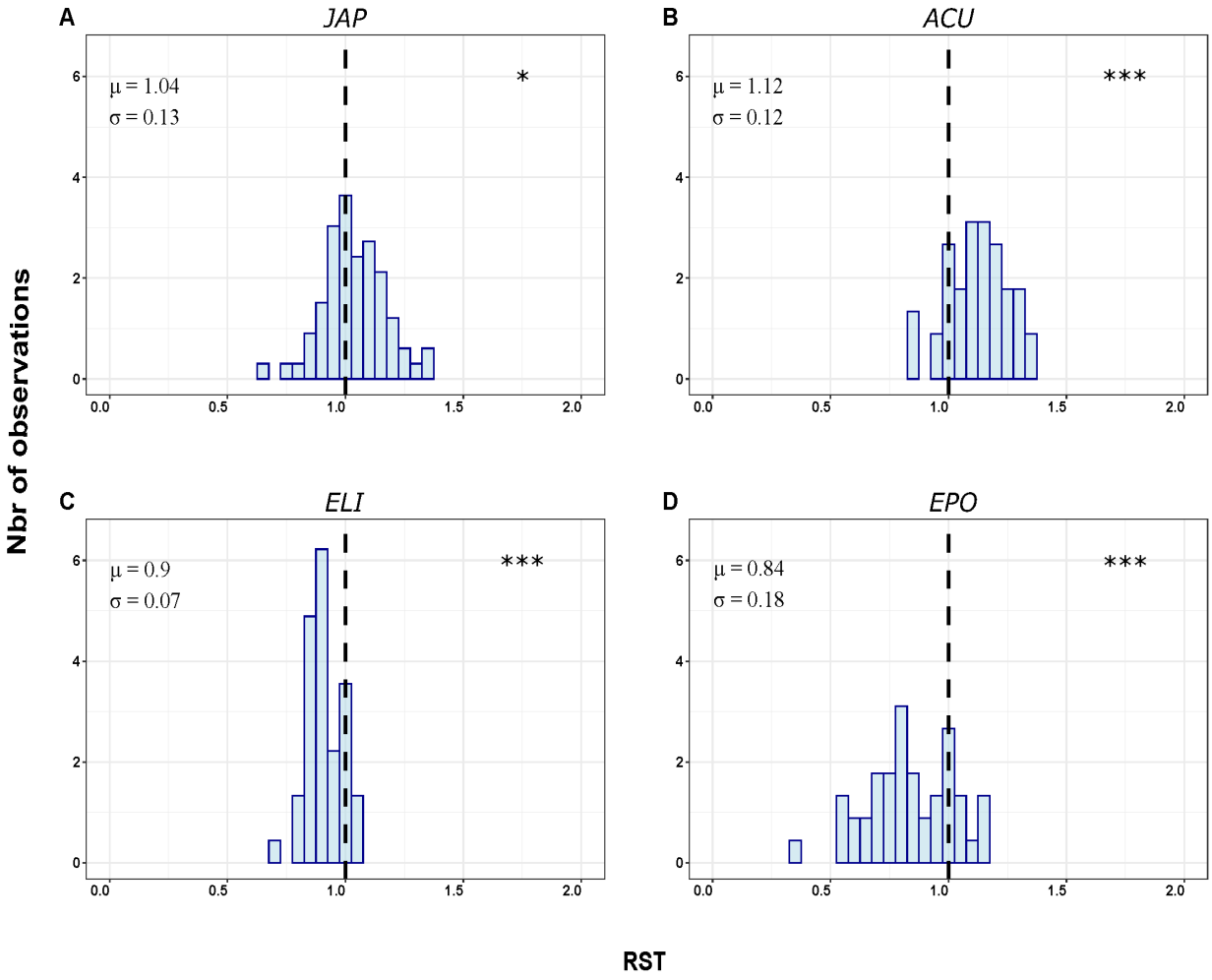


Figure.1 Effect of mixing intra-specific genotypes on disease susceptibility distribution

The effects of mixing genotypes were quantified with the RST index which represents the ratio between the average susceptibility of the two genotypes in mixture divided by the mean of the susceptibility two genotype in pure stands (see methods). Means (μ) and standard deviations (σ) are reported. A star symbol indicates a mean RST significantly different from 1 according to *t.test* (NS : $p > 0.1$,. : $p < 0.1$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$). RST index was calculated for each pair of the 4 matrices of plant-plant interactions tested in this study: A) Elite temperate japonica (JAP) (n=66), B) Acuce lines (ACU) (n=45), C) Elite Durum wheat (ELI) (n=45) and D) Lines from pre-breeding population(EPO)(n=45).

Specific interactions between focal and neighbour plants is the major effect explaining NMS

To investigate which of Direct or Indirect Genetic Effects contribute most to the observed variations in susceptibility, we looked at the output of our IGE:DGE model (See Methods; **Table 1**). DGEs were significant in three out of the four populations tested (JAP, ELI and EPO), indicating that intrinsic basal immunity is genetically variable in these populations. DGE accounted for up to 15% of the observed variation in susceptibility. In the case of the rice ACU matrix, there was no significant DGE, suggesting that all selected lines had similar susceptibility levels to the fungal strain used. The genetic effect of neighbours on susceptibility (IGE) was significant for JAP and EPO matrices but explained only a very small proportion of the variation (up to 1.4%) compared to DGE. The effect of specific plant-plant interactions (DGE:IGE) was significant in ACU and EPO matrices. Interestingly, in three of the matrices tested (ACU, ELI and EPO), the percentage of variation explained by specific plant-plant interactions reached comparable levels or was even higher (ACU matrix) than DGE. This suggests that plant-plant interactions resulting in NMS can reduce susceptibility to similar levels than basal immunity.

Table.1 Percentage of variation (eta²) explained by each factors of the models used

Set of genotypes	Basal resistance effect (DGE)	Neighbor effect (IGE)	Interaction effect (DGE:IGE)
JAP *(temperate japonica rice varieties)*	**15,3 % *****	**1,2 % ****	4,7 %
ACU *(Lines from Acuce landracea)*	0,6 %	0,6 %	**6,9 % *****
ELI *(Durum wheat varieties)*	**4,4 % *****	0,3 %	5,1 %
EPO *(Lines from pre-breeding population)*	**8,6% *****	**1,4 % ****	**7,8 % *****

.

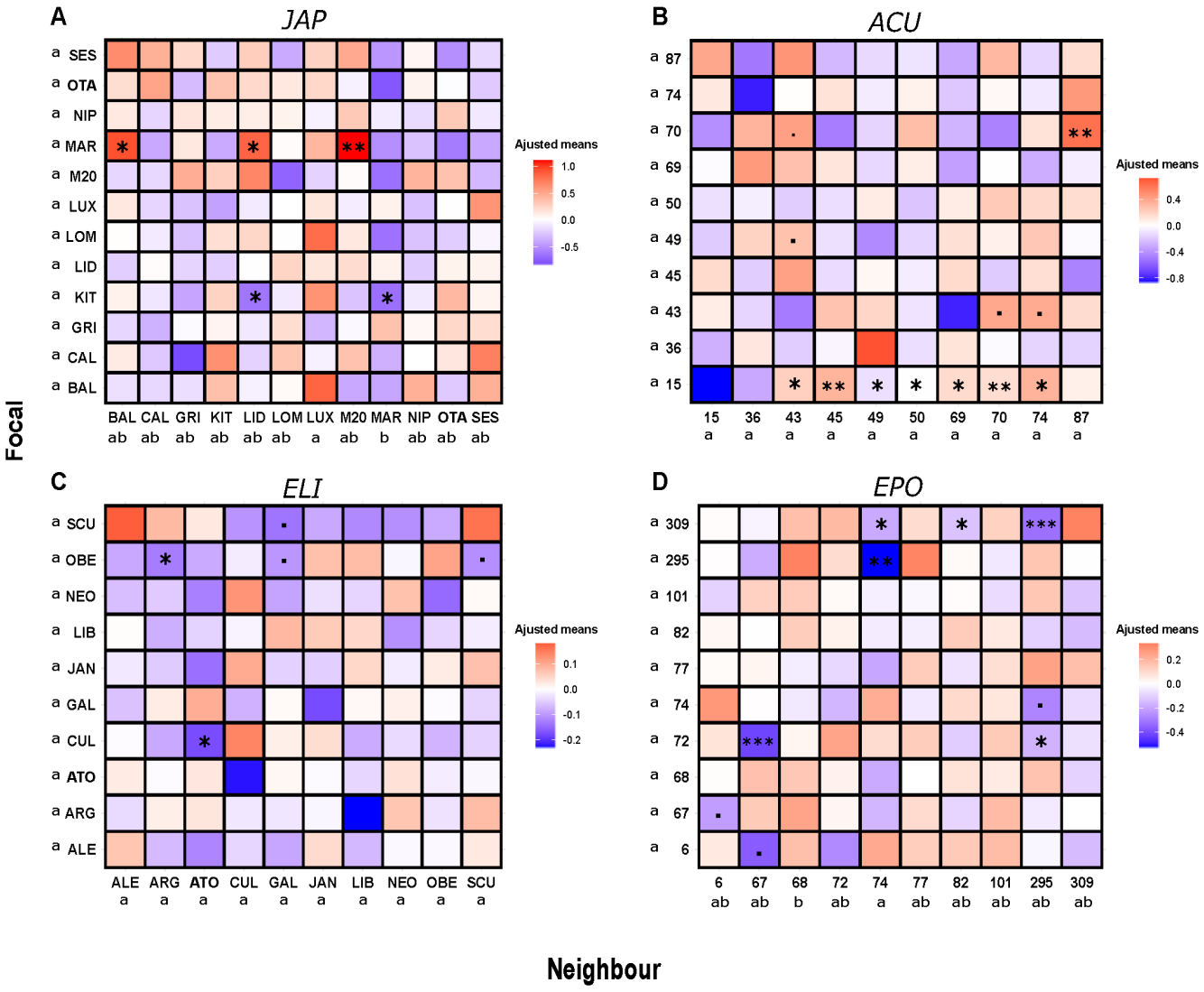


Figure.2 Modulation of disease susceptibility in intra-specific interactions

Each square corresponds to the adjusted mean (LSmean) of the susceptibility to pathogen of a specific focal plant (y axis) cultivated in presence of a specific neighbour (x axis) calculated from a model where DGE (intrinsic basal immunity) was included (See methods). A white colour indicates no effect of mixture on disease susceptibility, a red colour indicates that the focal plant becomes more susceptible in the presence of the neighbour and a blue colour indicate that the focal becomes less susceptible. A star symbol indicates a statistical difference detected by Dunnett test performed on the model described in Methods with the pure stand as reference (NS : $p > 0.1$,. : $p < 0.1$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$). The letter next to name of a focal plant indicates statistically significant group generated between focal by a Tukey HSD test on the model. Similarly, the letter next to name of neighbour plant indicates statistically significant group generated by a Tukey HSD test on the model.

Overall, among the 402 tested mixtures (222 in rice and 180 in wheat), 8% corresponded to situations where the susceptibility of at least one member of the pair was significantly affected by the identity of its neighbour (**Figure.2**). This percentage is consistent with previous observations (Pélissier *et al.*, 2021a). In rice, 11 combinations corresponded to cases where the susceptibility of the focal was significantly higher than its respective pure stand, whereas 2 were less susceptible. In a given mixture, there was no observed case of an increase of susceptibility in one genotype accompanying a reduction of susceptibility in the other. In wheat, 8 combinations corresponded to situations where the susceptibility of the focal was significantly affected by the identity of its neighbour. In all of them, the interactions reduced the susceptibility of the focal plant (**Figure.2**), with two mixtures (line 6 with 67 or line 74 with 295) where each focal genotype of the mixture showed reduced susceptibility when grown with the other. There was no correlation between the level of susceptibility of the neighbour genotype and the NMS phenotype on a given focal plant (**Supplementary figure.3**), consistent with previous results that NMS does not require the neighbour to be infected (Pélissier *et al.*, 2021a)

Some neighbouring genotypes had consistent effects on the susceptibility of focal plants: the rice variety LUX and the wheat line 68 generally increased susceptibility in their neighbourhood and conversely, the rice variety MAR and the wheat line 74 reduced it (**Figure.2**). Although our experimental design was not appropriate to search for focal plants that were generally responsive to their neighbours, it seemed that genotypes like line 15 or variety MAR in rice and line 309 or variety OBE in wheat were affected for their susceptibility by many intra-specific neighbours.

Discussion

Thus far, ecological barriers created by the introduction of diversity within fields were put forward to explain overall better disease control in varietal mixtures (Tilman *et al.*, 2002; Stenberg, 2017). In this study, disease levels of plants grown under controlled conditions, where most ecological barriers are not operating, were strongly dependent on whether plants were grown in mixtures and which neighbouring genotype they grew with. Our finding raises questions on the possible impact of direct plant-plant interactions on disease control in the field. Recent results suggest that plant-plant interactions mediated by allelic diversity at single loci could revert most effects produced by diversity in the field (Montazeaud et al, 2021). Similarly, we observe detrimental effects of NMS in the case of rice infected by *M. oryzae*, contrasting with the observation in the field that susceptibility to *M .oryzae* is reduced by 20% to 94% in mixtures (Zhu *et al.*, 2000; Raboin *et al.*, 2012). In that case, the removal plant-plant interactions that increase susceptibility could result in a strong improvement of disease control.

Out of the 402 mixtures tested in diverse sets of rice and wheat genotypes, we discovered 31 intra-specific mixtures (~8%) where disease susceptibility was modulated by plant-plant interactions. Thus Neighbour-Modulated Susceptibility is not a marginal phenomenon. In rice, we observed both significant positive and negative effects of the neighbours of the susceptibility of focal genotypes in each tested matrix, suggesting that the output of plant-plant interactions is yet difficult to predict. In contrast, in wheat, there was a global, unilateral and positive effect of growing in mixtures, focal plants showing lower disease susceptibility. This held true whatever the neighbouring genotype, suggesting that this case of NMS could be an example of cooperative behaviour in plants (Bilas *et al.*, 2021).

In three sets of genotypes tested, IGE values were significant in our IGE:DGE model. This strongly supports the idea that indirect genetic effects exist for disease susceptibility to pathogens in plants. Quite remarkably, we found that in the ACU and EPO matrices, disease reduction arising from interactions between genotypes (IGE:DGE) was higher than, or similar to intrinsic basal immunity (DGE). Thus NMS contribution to disease reduction is potentially high in intra-specific communities such as mixtures. In addition, we identified some specific genotypes whose susceptibility was affected in the same direction whatever their neighbours. Understanding how some genotypes modulate the susceptibility of their intra-specifics and what makes others responsive to their neighbours is clearly necessary to understand how plant-plant interactions affect their susceptibility to third parties that are pathogens. Considering NMS

as a property emerging from plant-plant interactions may renew our way of studying the evolutive drivers in intra-specific communities.

Genetic distance has been invoked as a driver for the outcome of plant-plant interactions (Biedrzycki *et al.*, 2010, 2011; Dudley *et al.*, 2013; Semchenko *et al.*, 2014). In our case, we found no link between genetic distance and NMS. A locus-by-locus approach might help identifying the mechanisms that trigger IGE and their interactions with DGE (Cortes *et al.*, 2021; Montazeaud et al, 2021).

Interestingly, IGE or DGE:IGE contributions were much less pronounced in elite varieties (JAP in rice and ELI in wheat) than in genotypes from diversified populations (ACU in rice and EPO in wheat). The ACU matrix is composed of lines that belong to a landrace known to be composed of heterogeneous genotypes that were grown together for hundreds of years in the same paddy fields (Xiahong *et al.*, 2011). The EPO matrix was made with lines that have recently been selected from a large genetic basis with wheat ancestors (David *et al.*, 2014). On the opposite, the JAP and ELI matrices were made using lines that have not been grown together and come from separate breeding programs. We speculate that NMS has been maintained in co-evolving varieties and possibly eliminated by breeding in JAP rice and ELI wheat elite varieties. In that case, using NMS for designing varietal mixtures that display low levels of disease susceptibility may require to go back to crop ancestors to recover interesting phenotypes for NMS that might have been lost during domestication and breeding (Reif *et al.*, 2005).

From an agro-ecological point of view, designing efficient varietal mixture is a major challenge (Litrico & Violle, 2015; Barot *et al.*, 2017; Mahaut *et al.*, 2020). In this context, our study brings a proof of concept that plant-plant interactions should be considered in designing varietal mixtures with interesting properties such as embedded crop protection.

Methods

Plant material and growth condition

We selected in each species (rice and wheat) a set of elite varieties and a set of lines originating from highly diversified populations. We chose their genotypes to maximize the genetic distance between genotypes in each set (see below). In order to reduce the impact of resistance genes on the disease phenotypes, we excluded the genotypes that were completely resistant to the pathogens used and only kept genotypes that were susceptible. Thus, for each genotype, the susceptibility value measured is a proxy of its basal immunity. For rice we selected 10 varieties in the *O. sativa* ssp temperate japonica cultivated in Europe (Italy and France) from Volante *et al.*, 2017 (JAP), and we added the two reference varieties Kitaake and Nipponbare. As second rice set, we selected 10 genotypes in the highly diversified, cultivated landrace called Acuce of *O. sativa* ssp indica from the Yuanyang terraces (Xiahong *et al.*, 2011) (ACU). For wheat we selected a set of 10 durum wheat varieties (ELI) from a durum wheat collection of seventy-eight commercial lines produced by French private companies (Rimbert *et al.*, 2018). For the second wheat set, we used 10 inbred lines (EPO) from an evolutionary pre-breeding population (David *et al.*, 2014). For each set, we grew each genotype in presence of itself ("Pure" condition) or each genotype in the presence of all possible other genotypes ("Mix" condition). Thus we constructed 4 matrices of all possible pairs of genotypes in each set. In the mix condition, each genotype was alternatively considered as a focal and as a neighbour. This represented 132 pairs of elite temperate japonica rice (JAP), 90 pairs of lines from the Acuce indica landrace (ACU), 90 pairs of cultivated French elite varieties (ELI) and 90 pairs of lines randomly selected from an experimental population (EPO), for a total of 402 intra-specific mixtures and 42 corresponding pure stands.

For rice, eight plants (4 of each genotype or 8 of the same genotype) were grown in plastic pots (9x9x9,5 cm) and for wheat, six plants (3 of each genotype or 3 of the same genotype) were grown in plastic pots (7 x 7 x 6 cm) filled with the appropriate substrate as described in Pélissier *et al.*, 2021a. Plants were grown three weeks and inoculated with the appropriate adapted pathogens. Each pot was randomly place in the experience and located by its position.

Pathogen inoculation and disease assessment

For rice, we selected the multivirulent CL26 strain (Gallet *et al.*, 2015) of hemibiotrophic fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* and performed inoculations as described in Berruyer *et al.* (2003) with a concentration of 100,000 conidia per ml. We inoculated wheat plants with a

multivirulent field isolate of *Puccinia triticina* from southern France (Bolton *et al.*, 2008) as described in (Ballini *et al.*, 2020). Six to seven days after inoculation, we scanned at the same resolution (600 pixels per inch) the symptoms of the latest, well-developed leaf of each focal plant per pot (3 for wheat and 4 for rice). Abnormal plants were not scored. We analysed images with LeAFtool (Lesion Area Finding tool), an home-developed R package available on github depository (Ravel, 2020) to obtain lesion number and leaf area. Parameters used for image analysis were at least 10 000 pixels for leaves and 50 pixels for lesion areas, with a blur at 1. To account for outliers and software mistakes, we removed from the analysis any lesion with aberrant size. Finally, we estimated leaf susceptibility by counting the number of a lesion per cm^2 of leaf area.

Selection of representative genotypes and calculation of genetic distance between them

For rice, we used a set of 19 997 SNPs common to the JAP and the ACU genotypes to calculate whole genome genetic distance. For wheat, we used a set of approximately 46 000 SNPs common to the ELI and the EPO genotypes. To apply a distance based approach, a dissimilarity matrix was computed for each set of genotypes using a shared allele index with DARwin software (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006).

Statistical analysis

a) Relative susceptibility of the mixtures

To compare the susceptibility of each mixtures to the susceptibility of its two pure stand components, we calculated the Relative Susceptibility Total (RST) index, inspired from the response ratio used in Borg *et al.* (2018), using the following formula :

$$\boldsymbol{RST}_{\mathbf{ij}} = \frac{\boldsymbol{Y}_{\mathbf{ij}} + \boldsymbol{Y}_{\mathbf{ji}}}{\boldsymbol{Y}_{\mathbf{ii}} + \boldsymbol{Y}_{\mathbf{jj}}}$$

Where $\boldsymbol{RST}_{\mathbf{ij}}$ is the RST for the mixture **ij**, and $\boldsymbol{Y}_{\mathbf{ij}}$ is the LSmeans of the susceptibility (see below) of the focal genotype **i** in the presence of the genotype **j** as neighbour. Under no effect of mixing genotypes, RST = 1. A RST < 1 indicates that the mixtures is less susceptible than the average of the two pure stand components, whereas RST > 1 means that the mixture is more susceptible than the average of the two pure stand components.

b) Statistical models for direct and indirect genetic effects on susceptibility

All statistical analysis were performed with R using (www.r-project.org). We looked whether focal plant susceptibility respond to neighbour identity using a linear model (packages "*Lme4*" and "*stats*"). We used a model that accounts for the effect of the focal genotype, known as the direct genetic effect (DGE), the effect of the neighbour, known as the indirect genetic effect (IGE) and the specific interaction between one specific focal and neighbor genotype (DGE x IGE) on disease susceptibility of the focal genotype, as follow:

$$\sqrt{\gamma focal} = Xb + I_f + I_n + I_f\ I_n + \epsilon$$

Where $\gamma focal$ denotes the susceptibility of the focal plant expressed as the number of lesions by cm² of leaf, Xb a vector of fixed effects including block and position, I_f the identity of the focal plant (DGE), I_n the identity of the neighbour plant (IGE), $I_f\ I_n$ the interaction of a specific focal with a specific neighbour (DGE x IGE), and ϵ the residual error. Square root transformation was used to correct for normality and homoscedasticity.

This model was used, for each of the four subsets of genotypes, to test the significance of the factors (DGE, IGE and DGE x IGE) and to calculate their eta² value by ANOVA. The eta² value (shown as percentage in **Table.1**) represents the variance explained by a given variable (here DGE, IGE or DGE:IGE) from the remaining variance after excluding the variance explained by other factors. This model was also used to calculate Least Square means (LSmeans, using the *eemeans* R package) of susceptibility for each focal in mixtures.

To identify specific combinations of genotypes for which the susceptibility of the focal genotype was significantly affected by the identity of its neighbouring genotype, we applied the following model for each focal genotype:

$$\sqrt{\gamma focal} = Xb + I_n + \epsilon$$

Where $\gamma focal$ denotes the susceptibility of the focal plant expressed as the number of lesions by cm² of leaf, Xb a vector of fixed effects including block and position, I_n the identity of the neighbour plant (IGE), and ϵ the residual error. Square root transformation was used to correct for normality and homoscedasticity.

Acknowledgements

We thank Andy Brousse for technical support.

Author contributions

RP, JBM, CV, FF and EB designed the experiments; RP, CT, AD and XQ produced the data; RP and MC performed the statistical analysis; JF, JD built the genetic matrices; RP, EB, HF, CV and JBM drafted the manuscript.

Reference

Ballini E, Tavaud M, Ducasse A, Sanchez D, Paux E, Kitt J, Charmet G, Audigeos D, Roumet P, David J, *et al.* 2020. Genome wide association mapping for resistance to multiple fungal pathogens in a panel issued from a broad composite cross-population of tetraploid wheat Triticum turgidum. *Euphytica* **216**: 92.

Barot S, Allard V, Cantarel A, Enjalbert J, Gauffreteau A, Goldringer I, Lata J-C, Le Roux X, Niboyet A, Porcher E. 2017. Designing mixtures of varieties for multifunctional agriculture with the help of ecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **37**: 13.

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun M-H, Tharreau D. 2003. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1139–1147.

Biedrzycki ML, Jilany TA, Dudley SA, Bais HP. 2010. Root exudates mediate kin recognition in plants. *Communicative & Integrative Biology* **3**: 28–35.

Biedrzycki ML, L V, Bais HP. 2011. Transcriptome analysis of Arabidopsis thaliana plants in response to kin and stranger recognition. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1515–1524.

Bijma P. 2014. The quantitative genetics of indirect genetic effects: a selective review of modelling issues. *Heredity* **112**: 61–69.

Bilas RD, Bretman A, Bennett T. 2021. Friends, neighbours and enemies: an overview of the communal and social biology of plants. *Plant, Cell & Environment* **44**: 997–1013.

Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF. 2008. Wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. *Molecular Plant Pathology* **9**: 563–575.

Borg J, Kiær LP, Lecarpentier C, Goldringer I, Gauffreteau A, Saint-Jean S, Barot S, Enjalbert J. 2018. Unfolding the potential of wheat cultivar mixtures: A meta-analysis perspective and identification of knowledge gaps. *Field Crops Research* **221**: 298–313.

Burdon JJ, Barrett LG, Rebetzke G, Thrall PH. **2014**. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications* **7**: 609–624.

Cortes LT, Zhang Z, Yu J. **2021**. Status and prospects of genome-wide association studies in plants. *The Plant Genome* **14**: e20077.

Cowger C, Mundt CC. **2002**. Effects of Wheat Cultivar Mixtures on Epidemic Progression of Septoria Tritici Blotch and Pathogenicity of Mycosphaerella graminicola. *Phytopathology®* **92**: 617–623.

David J, Holtz Y, Ranwez V, Santoni S, Sarah G, Ardisson M, Poux G, Choulet F, Genthon C, Roumet P, *et al.* 2014. Genotyping by sequencing transcriptomes in an evolutionary pre-breeding durum wheat population. *Molecular Breeding* **34**: 1531–1548.

Dudley SA, Murphy GP, File AL. **2013**. Kin recognition and competition in plants. *Functional Ecology* **27**: 898–906.

Frank SA. **2007**. All of life is social. *Current Biology* **17**: R648–R650.

Fréville H, Roumet P, Rode NO, Rocher A, Latreille M, Muller M, David J. **2019**. Preferential helping to relatives: A potential mechanism responsible for lower yield of crop variety mixtures? *Evolutionary Applications* **12**: 1837–1849.

Gaba S, Lescourret F, Boudsocq S, Enjalbert J, Hinsinger P, Journet E-P, Navas M-L, Wery J, Louarn G, Malézieux E, *et al.* 2015. Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. *Agronomy for Sustainable Development* **35**: 607–623.

Gallet R, Fontaine C, Bonnot F, Milazzo J, Tertois C, Adreit H, Ravigné V, Fournier E, Tharreau D. **2015**. Evolution of Compatibility Range in the Rice−Magnaporthe oryzae System: An Uneven Distribution of R Genes Between Rice Subspecies. *Phytopathology®* **106**: 348–354.

Jones JDG, Dangl JL. **2006**. The plant immune system. *Nature* **444**: 323.

Kristoffersen R, Jørgensen LN, Eriksen LB, Nielsen GC, Kiær LP. **2020**. Control of Septoria tritici blotch by winter wheat cultivar mixtures: Meta-analysis of 19 years of cultivar trials. *Field Crops Research* **249**: 107696.

Litrico I, Violle C. **2015**. Diversity in Plant Breeding: A New Conceptual Framework. *Trends in Plant Science* **20**: 604–613.

Mahaut L, Fort F, Violle C, Freschet GT. **2020**. Multiple facets of diversity effects on plant productivity: Species richness, functional diversity, species identity and intraspecific competition. *Functional Ecology* **34**: 287–298.

Mundt CC. **2002**. Use of Multiline Cultivars and Cultivar Mixtures for Disease Management. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 381–410.

Mundt CC. **2014**. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**: 446–455.

Mutic JJ, Wolf JB. **2007**. Indirect genetic effects from ecological interactions in Arabidopsis thaliana. *Molecular Ecology* **16**: 2371–2381.

Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wisser R, Balint-Kurti P. **2018**. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics* **19**: 21–33.

Pélissier R, Buendia L, Brousse A, Temple C, Ballini E, Fort F, Violle C, Morel J-B. **2021a**. Plant neighbour-modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures. *Journal of Experimental Botany* **Volume 72**: Pages 6570-6580.

Pélissier R, Violle C, Morel J-B. **2021b**. Plant immunity: Good fences make good neighbors? *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102045.

Raboin LM, Ramanantsoanirina A, Dusserre J, Razasolofonanahary F, Tharreau D, Lannou C, Sester M. **2012**. Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. *Plant Pathology* **61**: 1103–1111.

Ravel S. **2020**. *sravel/LeAFtool*.

Reif JC, Zhang P, Dreisigacker S, Warburton ML, van Ginkel M, Hoisington D, Bohn M, Melchinger AE. **2005**. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 859–864.

Reiss ER, Drinkwater LE. **2018**. Cultivar mixtures: a meta-analysis of the effect of intraspecific diversity on crop yield. *Ecological Applications* **28**: 62–77.

Rimbert H, Darrier B, Navarro J, Kitt J, Choulet F, Leveugle M, Duarte J, Rivière N, Eversole K, Le Gouis J, *et al.* 2018. High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLoS ONE* **13**: e0186329.

Sandroni M. **2020**. Plant resistance inducers (PRIs): perspectives for future disease management in the field. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **15**.

Semchenko M, Saar S, Lepik A. **2014**. Plant root exudates mediate neighbour recognition and trigger complex behavioural changes. *New Phytologist* **204**: 631–637.

Silva JC e, Potts BM, Bijma P, Kerr RJ, Pilbeam DJ. **2013**. Genetic control of interactions among individuals: contrasting outcomes of indirect genetic effects arising from neighbour disease infection and competition in a forest tree. *The New Phytologist* **197**: 631–641.

Stenberg JA. **2017**. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends in Plant Science* **22**: 759–769.

Subrahmaniam HJ, Libourel C, Journet E-P, Morel J-B, Muños S, Niebel A, Raffaele S, Roux F. **2018**. The genetics underlying natural variation of plant–plant interactions, a beloved but forgotten member of the family of biotic interactions. *The Plant Journal* **93**: 747–770.

Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. **2002**. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671–677.

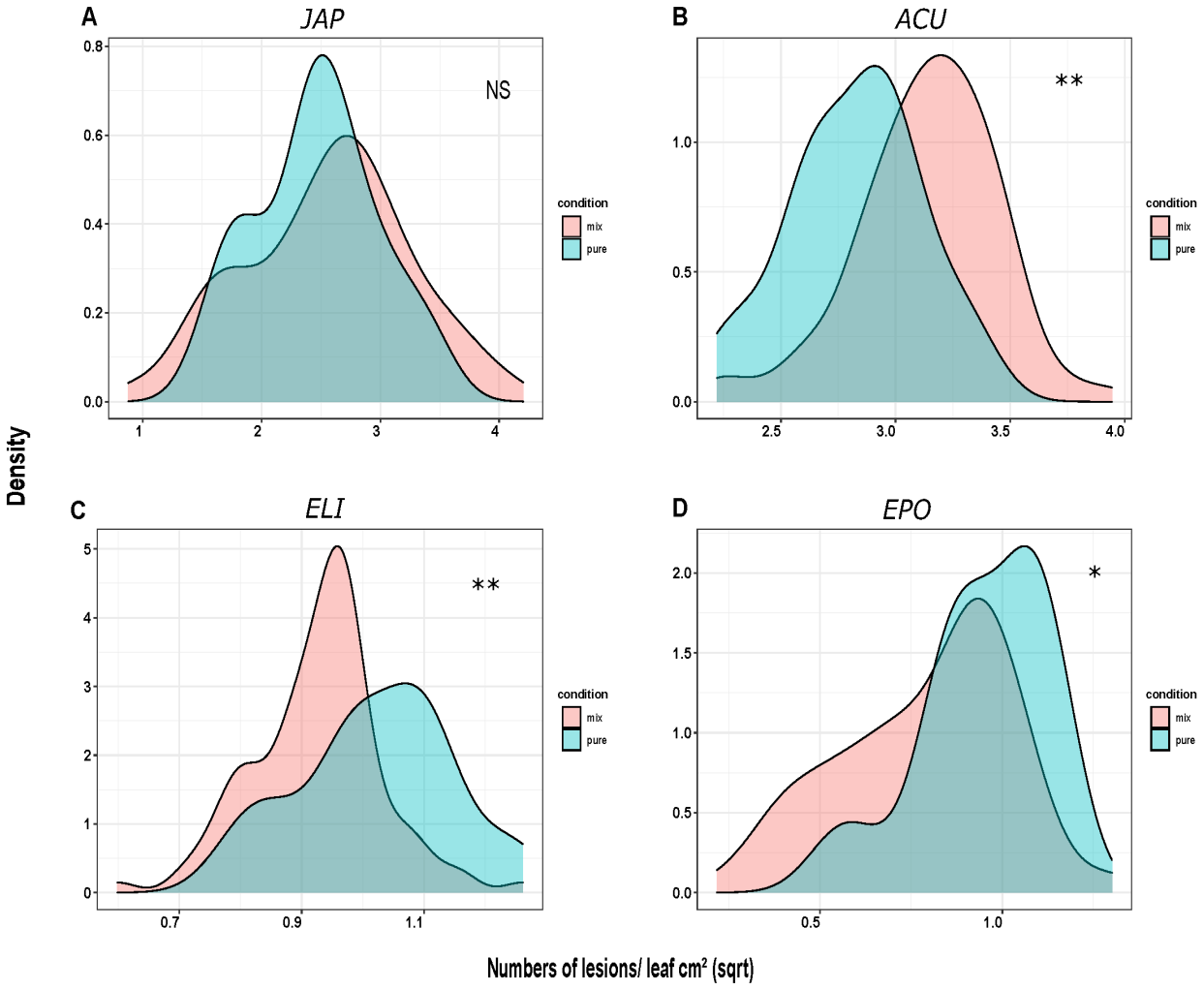
Volante A, Desiderio F, Tondelli A, Perrini R, Orasen G, Biselli C, Riccardi P, Vattari A, Cavalluzzo D, Urso S, *et al.* 2017. Genome-Wide Analysis of japonica Rice Performance under Limited Water and Permanent Flooding Conditions. *Frontiers in Plant Science* **8**.

Wolfe MS. **1985**. The Current Status and Prospects of Multiline Cultivars and Variety Mixtures for Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 251–273.

Xiahong H, Yan S, Dong G, Fugang W, Lei P, Cunwu G, Ruzhi M, Yong X, Chengyun L, Youyong Z. **2011**. Comparison of Agronomic Traits between Rice Landraces and Modern Varieties at Different Altitudes in the Paddy Fields of Yuanyang Terrace, Yunnan Province. *Journal of Resources and Ecology* **2**: 46–50.

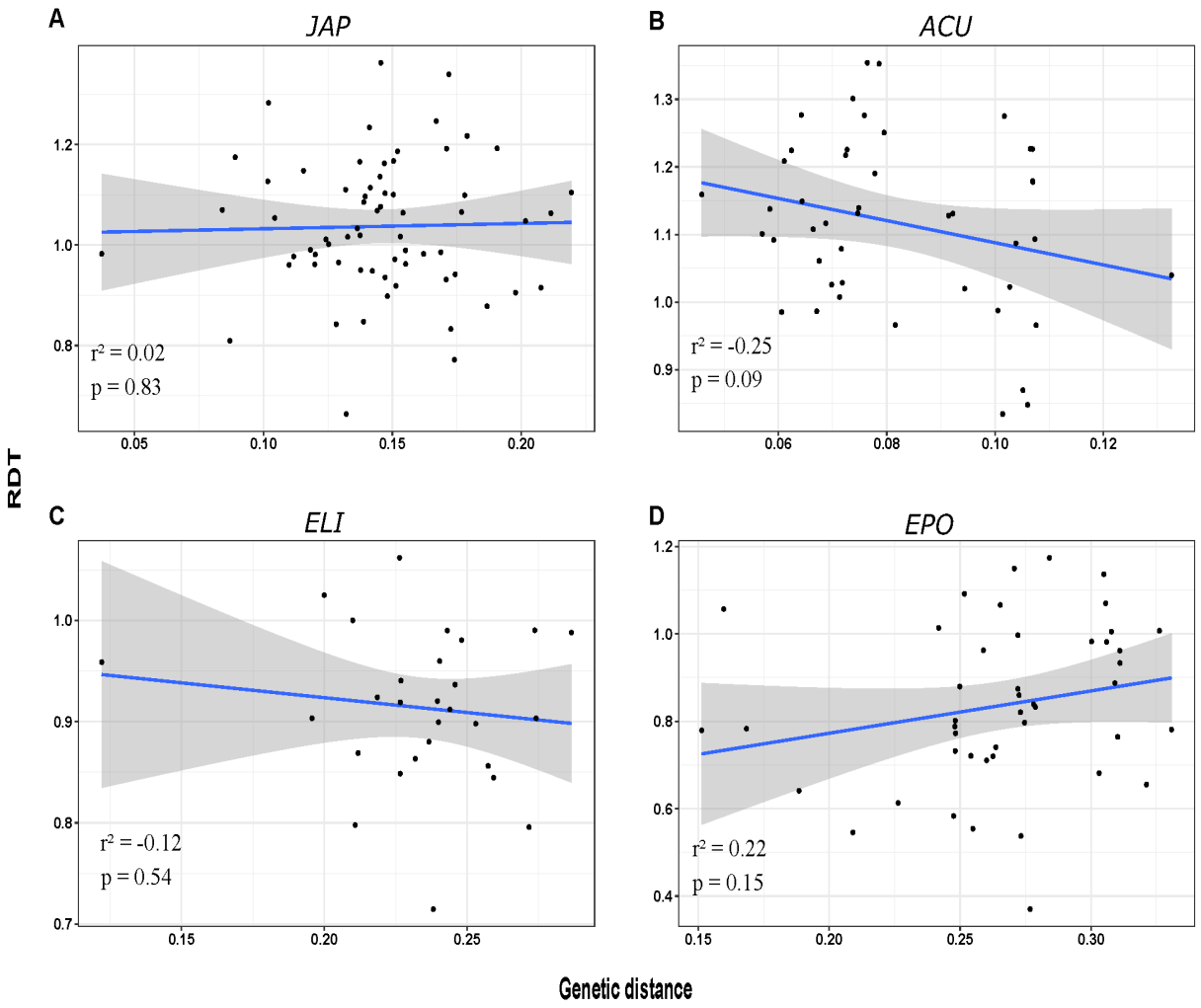
Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Li Y, Chen J, Fan J, Yang S, Hu L, Leung H, *et al.* 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* **406**: 718–722.

Supplementary information



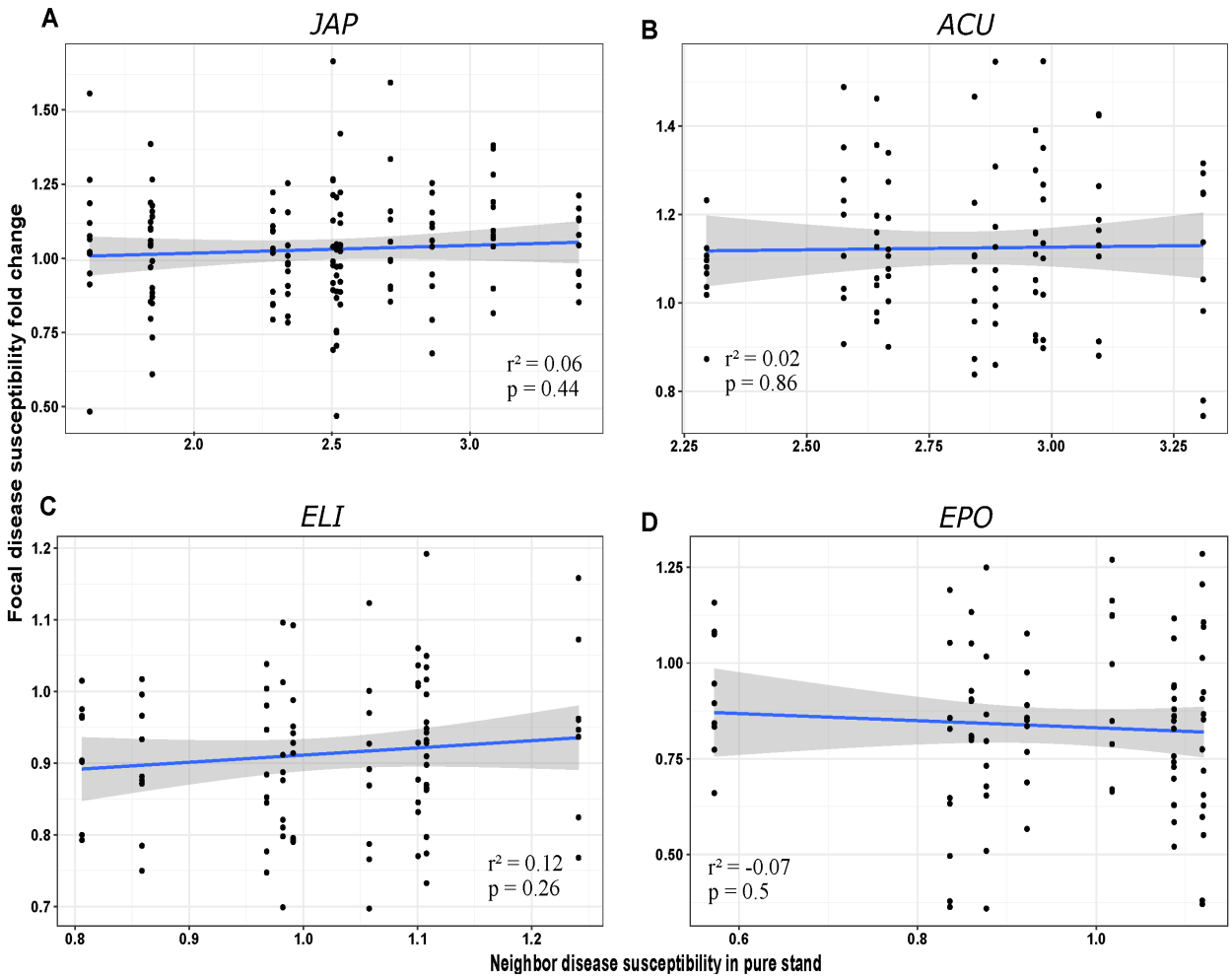
Supplementary Figure.1 Disease susceptibility of wheat and rice in intra-specific mixtures

Disease susceptibility means (number of lesions / leaf cm²) were quantified for each focal plant in the two different conditions: Pure stand (pure) and mixture (mix). LSmeans were calculated according to the model described in Method. Density of the LSmeans is represented for each combination for all the matrices tested in this study : A) Elite temperate japonica (JAP) (n=132 mix and 12 pure), B) Acuce lines (n=90 mix and 10 pure), C)) Elite Durum wheat (ELI) (n=90 mix and 10 pure) and D) Lines from pre-breeding population(EPO) (n=90 mix and 10 pure). A star symbol indicates a statistical difference detected by ANOVA performed on the model described in Methods between the pure and the mix conditions (NS : $p > 0.1$,. : $p < 0.1$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).



Supplementary Figure.2 Relation between genetic distance between genotypes and RST

RST values represent the ratio between the average susceptibility of the two genotypes in mixture divided by the mean of the susceptibility two genotype in pure stands (see Methods). For each set of genotypes, A) Elite temperate japonica (JAP) (n=66), B) Acuce lines (ACU) (n=45), C) Elite Durum wheat (ELI) (n=45) and D) Pre-breeding population (EPO) (n=45). RST has been plotted in function of the genetic distance between the two neighbours of the pair. Person correlation were calculated and R^2 and p.value are shown.



Supplementary Figure.3 Relation between susceptibility of the neighbour and its capacity to modulate susceptibility in a focal plant

We estimated the modulation of susceptibility in focal plant by a neighbour genotype by the fold change of susceptibility of a focal plant in the presence of the considered neighbour genotype. For each set of genotypes, A) Elite temperate japonica (JAP) (n=132), B) Acuce lines (n=90), C) Elite Durum wheat (ELI) (n=90) and D) Pre-Breeding Population (EPO) (n=90), the fold change was the ratio between the susceptibility of a focal plant in mixture with the given genotype divided by its value in pure stand. Person correlation were calculated and R^2 and p.value are shown.

Chapitre 1

Résultats complémentaires

Le phénotype NMS est-il dépendant du mode de vie de l'agent pathogène concerné ?

Expériences d'inoculation du pathogène *Bipolaris oryzae* dans les sous-populations de mélanges de riz Japonica tempérée et Acuce

I.Objectif et présentation de l'étude complémentaire

L'article ci-dessus nous a permis d'établir que les interactions plante – plante sont à l'origine de modifications de sensibilité à des agents pathogènes foliaires majeurs de deux céréales, le riz et le blé. Cependant nous n'avons pas pu faire d'*a priori* sur les mécanismes sous-jacents à cette modification. Dans l'hypothèse où le voisinage végétal module la sensibilité des plantes focales en modifiant leurs systèmes de défense (Epaisseur de la cuticule, expression des gènes de défense, concentration de certaines phytohormones …), l'étude de l'impact du voisinage sur deux agents pathogènes foliaires aux modes de vie et pouvoirs pathogènes contrastés peut nous renseigner sur les processus et mécanismes de réponses associés à la NMS chez le riz. En effet, si la NMS est plutôt associée à une modification de la production des phytohormones liées aux défenses, des phénotypes opposés de la NMS sont attendus car leurs actions sur la sensibilité des plantes dépendent du mode trophique des agents pathogènes (Huang *et al.*, 2020). Au contraire, si les réponses associées à la NMS impliquent une augmentation des défenses « mécaniques » de la plante, comme une production plus importante de cuticule ou de callose, un effet similaire de la NMS est attendu contre les différentes attaques fongiques (Underwood, 2012).

C'est pour cela que parallèlement aux expériences d'inoculation dans les sous-populations de riz cultivés japonica tempérés et Acuce avec l'agent pathogène *Magnaporthe oryzae* présentées dans l'article, nous avons réalisé d'autres expériences d'inoculations avec l'agent pathogène fongique responsable de l'helmintosporiose, *Bipolaris oryzae* (**Figure.10**). Au contraire de *M. oryzae* qui est un agent pathogène hémibiotrophe , *B. oryzae* (aussi appelé *Cochliobolus myabeanus)* est un agent pathogène nécrotrophe (Ou & Britain, 1985; Sunder *et al.*, 2014). Par ailleurs, les mécanismes d'attaque de ces deux agents pathogènes sont différents : alors que le pouvoir pathogène de *M. oryzae* repose sur une production d'effecteurs contrôlant la virulence du pathogène (Silue *et al.*, 1992; Shahriar *et al.*, 2020), l'infection de *B. oryzae* est basée sur la production de phytotoxines comme principaux facteurs de virulence pour causer la mort des cellules (Xiao *et al.*, 1991; Ahn *et al.*, 2005). Certaines des voies de défenses du riz sont communes à l'ensemble des infections fongiques (De Vleesschauwer *et al.*, 2013a), cependant des mécanismes d'infection différents impliquent aussi des mécanismes de défenses spécifiques du riz différents contre ces deux agents pathogènes (Ahn *et al.*, 2005).

Les questions abordées dans l'article traitant déjà de notions complexes et nouvelles, il ne nous a pas paru opportun de soulever des discussions supplémentaires sur l'influence du mode

trophique de l'agent pathogène ; de ce fait, les analyses présentées ici n'ont pas été ajoutées à l'article présenté dans le chapitre 1 et sont discutées dans cette partie.



Figure 10. Exemple de symptômes provoqués par *Bipolaris oryzae* sur feuilles de riz

Photo des lésions brunes provoquées par l'agent pathogène *B. oryzae*. L'helmintosporiose du riz est considérée comme une maladie re-émergente du riz dans plusieurs pays du monde (Savary *et al.*, 2019). Elle peut causer de nombreux dégâts sur les cultures de riz en affectant notamment le rendement (jusqu'à 90% de perte) et est considérée comme un agent pathogène d'intérêt majeur pour la recherche (Sunder *et al.*, 2014). Source H. Adreit, CIRAD, 2020.

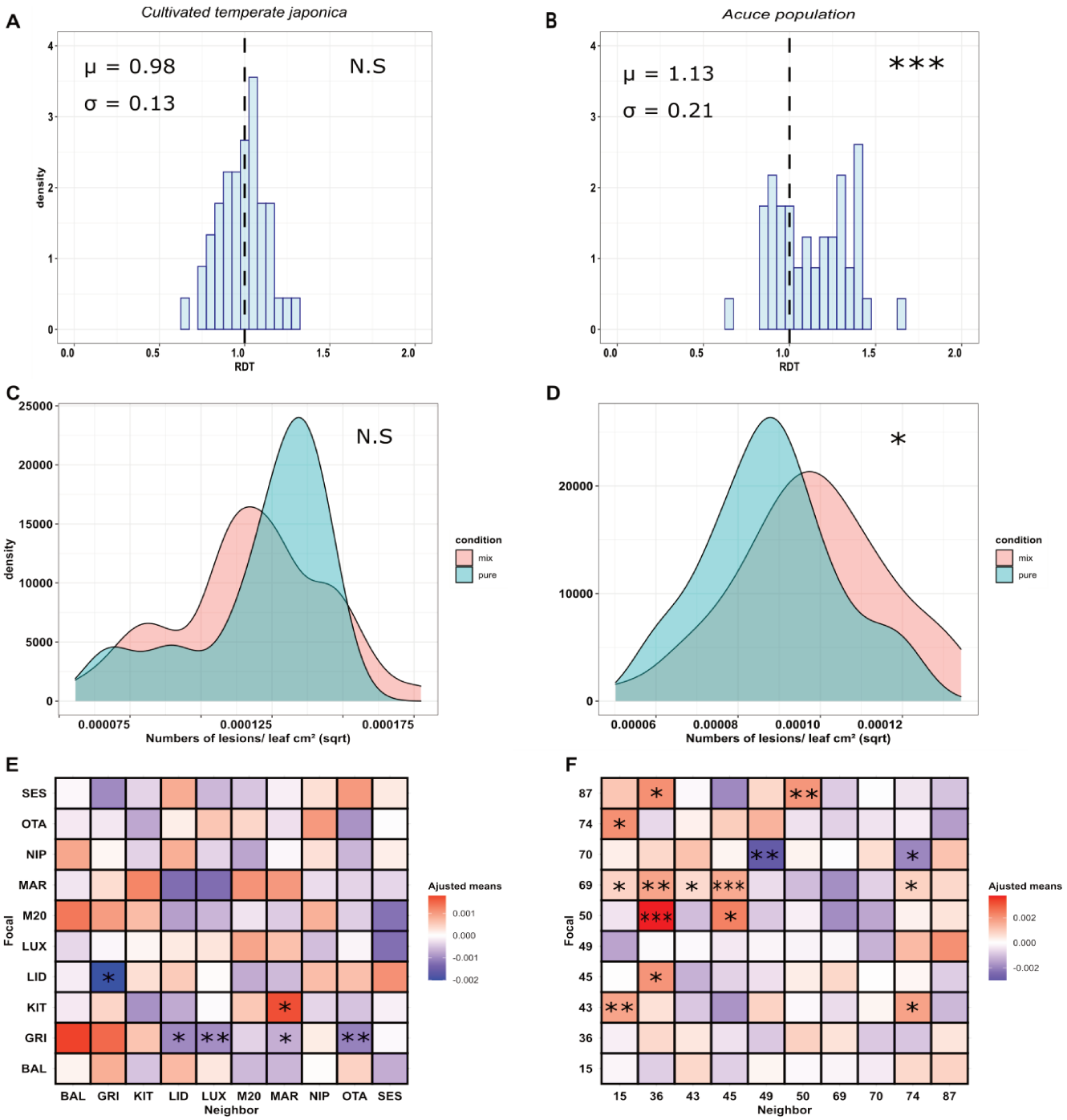


Figure 11. Résultat des expériences d'inoculations des matrices de mélanges de riz avec le pathogène *Bipolaris oryzae.*

L'expérience et les analyses ont été réalisés à l'identique de celles décrites pour M. oryzae dans l'article présenté en chapitre 1. (A-B) Distribution de l'index RST, les moyennes (μ) et les écart types (σ) sont rapportées pour chaque population. Une étoile indique un RST significativement différent de 1 selon un t test ($p<0.05$). (C-D) Distribution des moyennes ajustées des niveaux de sensibilité moyen en mélange et en condition pure pour chaque population. Une étoile indique une différence significative détectée par ANOVA sur le modèle statistique. (E-F) Moyennes ajustées de sensibilité générée sur un modèle où l'effet DGE a été retiré pour éviter la quantification de la résistance basale (Voir méthodes). Pour chaque sous-population, la LSmean est représentée par un carré de couleur représentant une sensibilité supérieure (rouge), inchangée (blanc), ou réduite (bleue) par le voisin. Le protocole d'inoculation et de notation des symptômes de B. oryzae est disponible dans l'article du chapitre 2.

II.Résultats

Afin d'étudier les réponses déclenchées par la NMS en terme de sensibilité à l'agent pathogène *B. oryzae*, nous avons utilisé le même protocole que dans l'article du chapitre 1 : des paires de deux génotypes ont été cultivées et inoculées ensembles en conditions contrôlées. Le calcul de l'indice RST dans les sous-populations indique que la sensibilité à *B. oryzae* n'est pas significativement modifiée dans les mélanges de riz japonica tempérés cultivés ($\mu = 0.98$, $\sigma = 0.13$, t test p value = 0.41) (**Figure.11.A**). A l'inverse, les indices RST issus de la sous-population de riz Acuce sont significativement différents de 1 ($\mu = 1.13$, $\sigma = 0.21$, t test p value < 0.001). A l'instar de nos observations du chapitre 1 où la sensibilité à *M. oryzae* est augmentée de 12%, la population Acuce en mélange est 13% plus sensible à l'agent pathogène *B. oryzae* (**Figure.11.B**). Sans surprise, ce résultat est corrélé à l'analyse des distributions des niveaux de sensibilité moyens issus de nos modèles. En effet, le nombre moyen de lésions par cm² est significativement plus important en mélange qu'en condition pure pour les variétés Acuce ($p = 0.04$) alors qu'il n'est pas différent pour les variétés de japonica tempéré ($p = 0.68$).

Dans la population de Japonica, 6 interactions sur 90 ont été détectées comme ayant un impact significatif sur la sensibilité de leur plantes focale, un nombre supérieur à celui observé pour *M. oryzae* où seulement 5 interactions sur 132 étaient significatives. Similairement, 15 interactions avaient un impact significatif sur la sensibilité à *B. oryzae* dans la matrice des variétés Acuce (12 sur 90 dans la matrice *M. oryzae*). Il est intéressant de constater que dans les deux cas, les interraction qui montraient un effet de NMS lors des inoculations avec *M. oryzae* ne sont pas les même qui montrent des effets de NMS avec *B. oryzae.*

Les résultats de nos modèles présentés dans le **Tableau.1** montrent que la part relative des effet de DGE et IGE dans les réactions de NMS observés dans le cas d'infection par *B. oryzae* est du même ordre de grandeur que ceux observés précédemment dans le cas d'infection avec *M. oryzae dans* les 2 matrices de variétés de riz testées. En effet, dans la population de variétés cultivées de japonicas tempérés, la résistance intrinsèque des variétés (6.1% ; DGE) est supérieure à l'effet d'interaction (2.9%) qui était lui-même supérieur à l'effet du voisinage (0.1%). Cependant alors que dans la matrice *M. oryzae* l'effet de voisinage était significatif mais pas l'effet d'interaction, dans la matrice *B. oryzae* c'est l'effet d'interaction qui est significatif alors que l'effet de voisinage est quasiment nul (0 .1%). Il est aussi intéressant de constater que dans la matrice des variétés Acuce, tous les effets sont significatifs, au contraire de seulement l'effet d'interaction dans la matrice *M. oryzae*.

Dans la population de japonicas tempérés, aucune plante focale et aucune plante voisine n'ont été détectées comme significativement différentes des autres dans leur effet de DGE et IGE en mélange. En revanche dans le cas des variétés Acuce, les analyses statistiques ont permis de montrer que certaines variétés avaient un fort effet d'IGE (**Tableau.1**). Par exemple, la variété 36 rend les plantes focales plus sensibles tandis que les variétés 45, 49, 69 et 70 a tendance à réduire la sensibilité de leurs plantes focales. Similairement à l'expérience menée sur *M. oryzae* dans l'article 1, notre expérience n'était pas adaptée à la recherche de plantes significativement affectées de façon générale par le voisinage. Néanmoins l'observation des résultats semble montrer que chez les Japonicas tempérés la sensibilité à *B. oryzae* de la variété GRITNA est positivement affectée par la présence d'un voisinage. Similairement la variété 69 de la population Acuce semble voir sa sensibilité à *B. oryzae* accrue par la présence d'un voisinage.

Tableau.1 : Analyses statistique et eta² des différents effets génétiques pour les inoculations du pathogène *B. oryzae* dans les matrices de riz

Population	Basal resistance (DGE)	Neighbor effect (IGE)	Interaction effect (DGE:IGE)
Cultivated temperate japonica	**6.1 % *****	0.1 %	**2.9 % *****
Acuce population	**1 %*****	**1.1 %*****	**7 % *****

Pour tester si la distance génétique entre les membres de chaque mélange influençait le phénotype de NMS en réponse à *B. oryzae*, nous avons recherché une corrélation entre le RST et la distance génétique entre les génotypes de chaque mélange. Aucune corrélation significative de Pearson n'a été trouvée dans aucune des deux populations testées, confirmant nos résultats observés sur *M. oryzae* (résultat non montré).

III.Discussions

Alors que la sensibilité à *M. oryzae* est augmentée en mélange dans les deux populations de riz testées dans la précédente expérience (Chapitre 1, **Figure.1**), elle n'est augmentée ici que dans la population Acuce. Cette augmentation est de même intensité que ce qui a été observé pour *M. oryzae*. De plus, bien que de même ordre de grandeur que dans l'expérience

d'inoculation précédente, les effets de DGE, IGE et d'interaction DGE:IGE étaient plus significatifs dans cette expérience pour les variété Acuce. Ce résultat indique une plus forte variation de sensibilité basale des variétés entre elles, mais aussi des effets génériques de certains voisins (IGE significative) sur la sensibilité de leur plante focale en plus des effets d'interactions déjà observés au préalable. Etonnamment aucun effet de voisinage (IGE) significatif n'a été détecté chez les variétés japonicas tempérées alors qu'il était significatif dans l'expérience précédente ; néanmoins l'effet d'interaction significatif indique que les effets de NMS sur *B .oryzae* semblent être liés aux interactions plutôt qu'à des effets génériques de voisinage.

Ces résultats confirment donc que l'effet du voisinage intra-spécifique sur la sensibilité contre les agents pathogènes (NMS) est plus important dans la sous-population Acuce que chez les variétés Japonicas tempérées, indépendamment de l'agent pathogène considéré.

De plus, le fait que 9.5 % des interactions se sont révélées significatives l'expérience avec *M. oryzae* et dans 11.5 % des cas avec *B. oryzae* semble indiquer que les modifications de sensibilité significatives dues aux interactions plantes/plantes chez les deux populations de riz représentent en moyenne 10%.

Néanmoins, ils montrent aussi que la NMS ne dépend pas seulement de l'assemblage des variétés entre elles mais qu'elle peut aussi être fonction de l'agent pathogène testé. En effet, les effets de voisinage (IGE) et d'interaction (IGE :DGE) ne sont pas similaires entre les deux agents pathogènes, surtout dans le cas des mélanges de variétés Japonicas tempérées. Cela semble donc contredire l'hypothèse que la NMS modifie la sensibilité des plantes focales par un mécanisme unique, en modifiant l'immunité ou la balance hormonale par exemple. En effet dans ce cas on aurait pu s'attendre à une réponse opposée en fonction du mode de vie de l'agent pathogène (Huang *et al.*, 2020), comme observé pour l'inducteur de défense Benzothiadazole qui augmente la résistance à *M. oryzae* et diminue la résistance à *B. oryzae* (Ahn *et al.*, 2005).

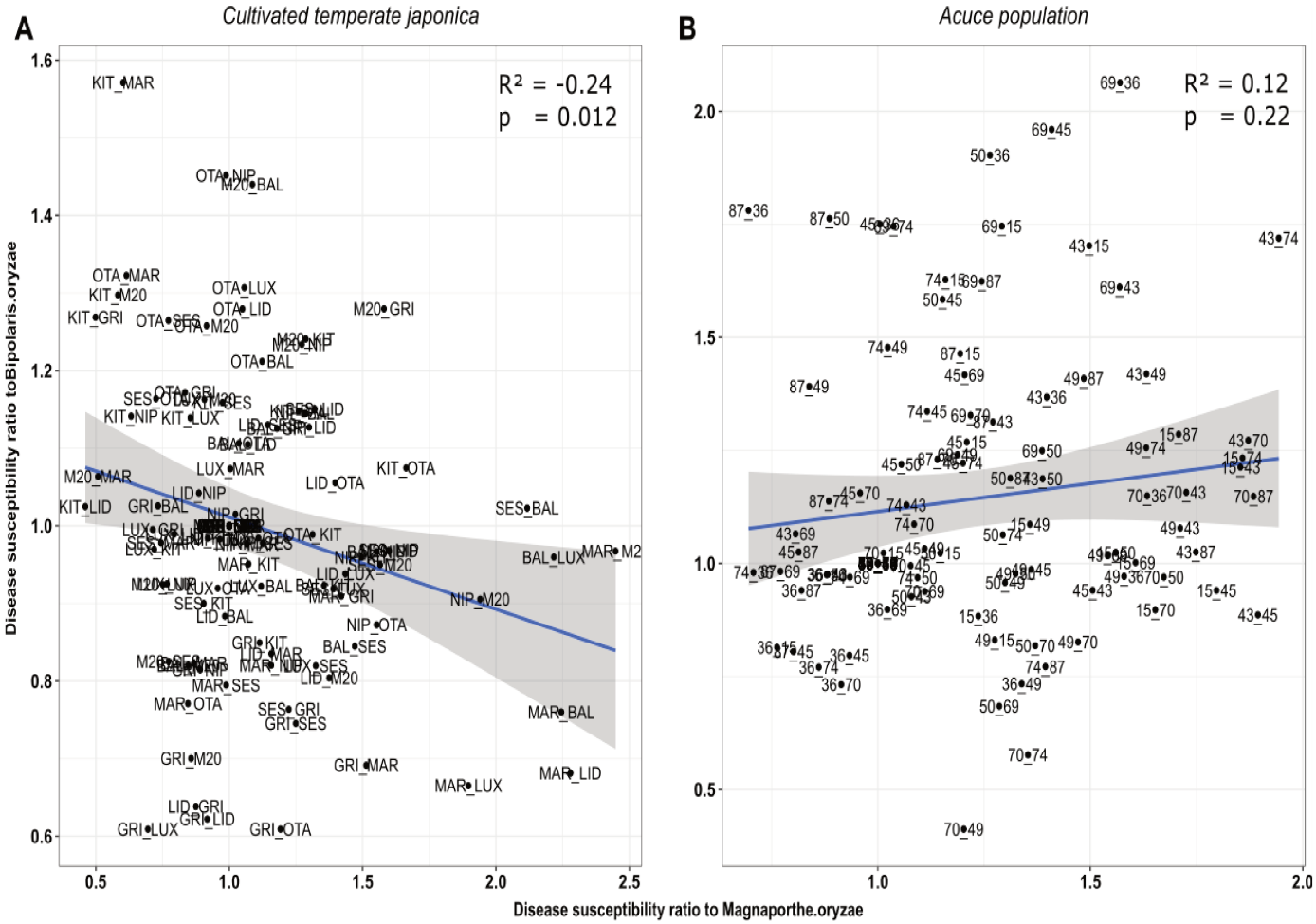


Figure 12. Corrélation entre les ratios de sensibilité à *M. oryzae* et *a B. oryzae* dans les deux populations de riz testées

Les ratios ont été calculés en divisant le LSmeans de chaque plante focale en présence d'un voisin intra-spécifique par son Lsmeans en culture pure pour chaque agent pathogène. Ici une plante focale est donc représentée par sa valeur de ratio (représentant l'impact d'un voisin sur sa sensibilité) à M. oryzae en abscisse et à B. oryzae en ordonnée. Les corrélations ont été calculées par la méthode de Pearson, le R^2 (pente) et la p value sont montrés.

Cependant il est intéressant de constater que certaines variétés, au sein de la population des Japonicas tempérés, ont des réponses NMS opposées vis-à-vis des deux agents pathogènes. C'est le cas notamment des variétés Kitaake et Maratelli. En effet, alors que les différents voisin testés ont plutôt tendance à réduire la sensibilité de la variété Kitaake à *M. oryzae*, ils ont plutôt tendance à augmenter sa sensibilité à *B. oryzae* par rapport à sa culture pure. Un tel phénomène n'est pas visible dans la sous-population de riz Acuce. Ce résultat nous a amené à reprendre les analyses des données acquises sur les premières expérience inoculée avec *M. oryzae*. Ainsi nous avons repris les taux de variation induits par chaque voisin sur chaque variété lors de l'infection avec *M. oryzae* et nous les avons comparés aux taux obtenus pour *B. oryzae* (**Figure.12**). Comme pressenti sur la base de l'observation des résultats de Kitaake et Maratelli, une corrélation négative significative (coefficient de Pearson de -0.24) a été détectée chez les variétés japonicas tempérées. Ceci indique que plus un génotype voisin augmente la sensibilité d'une plante focale à *M. oryzae*, plus il diminue sa sensibilité à *B. oryzae* et inversement. Ce résultat n'est pas observé chez les Acuce où aucune corrélation significative n'a été détectée. Du côté de la sous-population des Japonicas tempérés, ce résultat peut, dans un premier temps, être expliqué par une forte contribution des variétés Maratelli et Kitaake dans la corrélation. Ensuite dans un deuxième temps, ce résultat peut suggérer que les réponses associées à la NMS impliquent chez les japonicas tempérés, mais pas chez la sous-population Acuce, des mécanismes de défense qui génèrent des différences de sensibilité à *M. oryzae* et *B. oryzae* comme par exemple la régulation de gènes lié à la mort cellulaire. En effet, la mort cellulaire chez le riz peut jouer un double rôle dans la résistance et le développement des maladie, selon la nature de l'agent pathogène (nécrotrophe ou biotrophe) (Mengiste, 2012; Fan *et al.*, 2018).

De manière générale nos résultats montrent que l'hypothèse d'une implication de l'immunité dans la NMS ne peut pas être vérifiée pour toutes les sous-populations (Acuce) ou pour toutes les combinaisons au sein des japonicas tempérés. Cependant, dans le cas des variétés Maratelli et Kitaake, il semble néanmoins intéressant de vérifier si la NMS implique bien des modifications de l'immunité, notamment de gènes impliqués dans des voies associées à la régulation préférentielle des agents pathogènes biotrophes ou nécrotrophes.

Chapitre 2

Plant neighbour modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures

Article de recherche publié dans le Journal of Experimental Botany.

Rémi Pélissier, Luis Buendia, Andy Brousse, Coline Temple, Elsa Ballini, Florian Fort, Cyrille Violle, Jean-Benoit Morel, Plant neighbour-modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures, *Journal of Experimental Botany*, Volume 72, Issue 18, 30 September 2021, Pages 6570–6580, https://doi.org/10.1093/jxb/erab277

Cet article a fait l'objet d'un article de commentaire dans la rubrique « Insight » du Journal of Experimental Botany (Bancal, 2021).

Marie-Odile Bancal, Plant–plant communication in variety mixtures plays on disease susceptibility and immunity, *Journal of Experimental Botany*, Volume 72, Issue 18, 30 September 2021, Pages 6084–6086, https://doi.org/10.1093/jxb/erab377

I.Présentation générale

Dans le chapitre précèdent, nous avons montré que les interactions plante-plante pouvaient être à l'origine de modifications de sensibilité à différents agents pathogènes. Ces modifications ne sont pas liées à la distance génétique entre les génotypes du mélange. De plus, aucun effet général d'un génotype à avoir une aptitude à modifier la sensibilité de sa plante voisine ou à être impacté par son voisinage n'a été détecté. La modulation de la sensibilité aux agents pathogènes par le voisinage semble donc plus dépendre de l'interaction spécifique entre un génotype focal et un génotype voisin. Ce phénomène, que nous avons nommé NMS (Neighbour-Modulated Susceptiblity), peut impacter de manière variable la sensibilité à des agents pathogènes présentant différents modes de vie. Ces observations suggèrent donc que plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la NMS et induire des réponses différentes dans les plantes.

Dans ce deuxième chapitre, nous avons souhaité explorer plus finement les mécanismes de déclenchement de la NMS et les réponses associées dans les plantes focales. Nous avons sélectionné deux couples de génotypes de blé et de riz présentant des phénotypes NMS forts et réciproques (Kitaake-Lido pour le riz et Cultur-Atoudur pour le blé).

Pour vérifier nos observations faites dans le chapitre 1 sur le riz, ces couples ont été inoculés avec des agents pathogènes présentant différents modes de vie (biotrophe, nécrotrophe et hémibiotrophe). Par ailleurs, dans le but d'apporter plus de précisions sur l'origine du ou des signaux pouvant être échangés entre les voisins, nous avons testé l'implication du compartiment souterrain dans les réactions associées à la NMS. Pour ce faire nous avons réalisés des expériences d'inoculation où les compartiments racinaires entre les génotypes en mélange était séparés par différents types de séparation (poreuse ou non). Nous avons aussi testé l'implication du microbiote racinaire en le supprimant du sol par autoclavage avant le semis des génotypes. Puisqu'il est connu dans la littérature qu'une plante peut modifier la sensibilité de la plante voisine lorsqu'elle est elle-même soumise à une attaque, nous avons testé les phénotypes de NMS dans des expériences où seulement un génotype du mélange était inoculé. Enfin, pour évaluer notre hypothèse sur l'implication de l'immunité dans les réactions de NMS, nous avons mesuré l'expression de gènes de défenses dans chacun des génotypes des mélanges avant et après inoculation par l'agent pathogène.

Journal of Experimental Botany
https://doi.org/10.1093/jxb/erab277 Advance Access Publication 14 June, 2021
This paper is available online free of all access charges (see https://academic.oup.com/jxb/pages/openaccess for further details)

RESEARCH PAPER

Plant neighbour-modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures

Rémi Pélissier[1,†], Luis Buendia[2,†], Andy Brousse[3], Coline Temple[3], Elsa Ballini[1], Florian Fort[4], Cyrille Violle[5] and Jean-Benoit Morel[3,*]

[1] PHIM Plant Health Institute, Université de Montpellier, Institut Agro, CIRAD, INRAE, IRD, Montpellier, France
[2] PHIM Plant Health Institute, Université de Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, Montpellier, France
[3] PHIM Plant Health Institute, Université de Montpellier, INRAE, CIRAD, Institut Agro, IRD, Montpellier, France
[4] CEFE, Université de Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Institut Agro, Montpellier, France
[5] CEFE, Université de Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

* Correspondence: jean-benoit.morel@inrae.fr
† Joint first authors.

Received 15 February 2021; Editorial decision 7 June 2021; Accepted 11 June 2021

Editor: Richard Napier, University of Warwick, UK

Abstract

As part of a trend towards diversifying cultivated areas, varietal mixtures are subject to renewed interest as a means to manage diseases. Besides the epidemiological effects of varietal mixtures on pathogen propagation, little is known about the effect of intraspecific plant–plant interactions and their impact on responses to disease. In this study, genotypes of rice (*Oryza sativa*) or durum wheat (*Triticum turgidum*) were grown with different conspecific neighbours and manually inoculated under conditions preventing pathogen propagation. Disease susceptibility was measured together with the expression of basal immunity genes as part of the response to intra-specific neighbours. The results showed that in many cases for both rice and wheat susceptibility to pathogens and immunity was modified by the presence of intraspecific neighbours. This phenomenon, which we term 'neighbour-modulated susceptibility' (NMS), could be caused by the production of below-ground signals and does not require the neighbours to be infected. Our results suggest that the mechanisms responsible for reducing disease in varietal mixtures in the field need to be re-examined.

Keywords: Disease, immunity, intraspecific mixture, neighbour, *Oryza sativa*, plant–plant interactions, rice, *Triticum turgidum*, wheat.

Introduction

Increasing biodiversity in cultivated systems is considered as a promising approach for improving agricultural sustainability (Tilman *et al.*, 2002), in particular to mitigate the impact of diseases (Stenberg, 2017). For instance, mixing varieties of a single species has been successfully applied at the field level to control major foliar pathogens, including *Septoria* disease and leaf rust in wheat (Kristoffersen *et al.*, 2020) and blast fungus in rice (Zhu *et al.*, 2000; Raboin *et al.*, 2012). In such varietal

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

mixtures, well-known resistance genes have strong negative impacts on pathogen dispersal (Burdon *et al.*, 2014), and the resulting resistance is less easily prone to breakdown (Garrett and Mundt, 1999; Burdon *et al.*, 2014). However, choosing varietal components that have high mixing abilities remains a challenge (Barot *et al.*, 2017). Selecting varietal mixtures where immunity is finely regulated by plant–plant interactions (Zhu and Morel, 2019; Pélissier *et al.*, 2021) could provide a means to enhance resistance and its durability. Addressing the very poorly studied question of the physiological effects of varietal mixtures requires experiments under controlled environments that are independent of the processes affecting pathogen propagation that reduce susceptibility at the field scale.

Plants possess a basal immune system that is constitutively expressed at low levels, and can be induced by pathogens (Jones and Dangl, 2006). Genes related to pathogenesis are among those typically induced during this basal immune response (Jones and Dangl, 2006; Ali *et al.*, 2018). The constitutive and inducible expression of this immune system confers basal levels of immunity and leads to reduced susceptibility. Depending on the pathogen lifestyle (biotrophic or necrotrophic), different signalling pathways are involved for triggering basal immunity (De Vleesschauwer *et al.*, 2014). Abiotic factors in the environment in particular can modulate basal immunity (Nobori and Tsuda, 2019). Neighbours such as non-pathogenic microbial organisms surrounding the plant can also affect basal immunity and susceptibility to subsequent pathogen attack, a phenomenon called 'microbiota-modulated immunity' (Vannier *et al.*, 2019). However, little attention has been paid to plants themselves as neighbours that can potentially modulate basal immunity and pathogen susceptibility (Stenberg, 2017).

The limited reports that are available indicate that plant–plant interactions can modify immunity and susceptibility to pathogens (Zhu and Morel, 2019; see Pélissier *et al.*, 2021, for a review). Plant–plant interactions can occur between conspecifics (intraspecific interactions) or heterospecifics (interspecific interactions) and can be subdivided into different categories depending on whether they result from direct signalling between plants (chemical or physical signals exchanged) or are mediated by another, third biological agent (e.g. moving pathogen or microbiome), or whether they require that the neighbour is healthy or not (e.g. wounded or infected). On the one hand, indirect interactions involving biological agents moving from sick plants to healthy ones have been documented in several instances in both inter- and intraspecific interactions (Zhu and Morel, 2019; Pélissier *et al.*, 2021). The way these interactions increase resistance is that spores of a pathogen adapted to a host plant migrate to a neighbouring plant to which it is not adapted, thereby stimulating basal immunity and preparing this plant for later infections ('premunition'). On the other hand, direct interactions are well illustrated by volatile organic compounds that are produced by attacked or wounded plants and are transported to neighbouring, healthy plants that, in turn, develop immunity and resistance (Heil and Karban, 2010; Schuman *et al.*, 2015; Ninkovic *et al.*, 2019). This has been shown in both inter-and intra-specific plant–plant interactions, in particular against insects (Karban *et al.*, 2000, 2006). In the case of intraspecific interactions, such a phenomenon is called 'eavesdropping' (Rebolleda-Gómez and Wood, 2019) where a previously unaffected plant primes its defenses after perceiving a signal emitted by the neighbouring, attacked plant. While there are many report that sick or attacked plants can signal danger to neighbours, thus triggering their immunity and reducing their susceptibility (Cheol Song *et al.*, 2016; Wenig *et al.*, 2019), very few studies have indicated that heathy plants can directly affect immunity in their plant neighbourhood.

Plant–plant interactions are also mediated by alterations of resource availability. For instance, the reduction of light availability provoked by the shade of neighbours can alter immunity and susceptibility to pathogens ('shade-avoidance syndrome'; Ballaré and Pierik, 2017). The plant density of the neighbourhood has also been shown to affect immunity (e.g. Chen *et al.*, 2019). In addition to density and the associated shade-avoidance syndrome, the identity of the neighbour has been shown to affect immunity (Subrahmaniam *et al.*, 2018; Zhu and Morel, 2019). For instance, Arabidopsis grown in the presence of healthy *Hieracium pilosela* shows modifications to its transcriptome that are similar to the those observed during pathogen infection (Schmid *et al.*, 2013). It has also been reported that cultivation of maize and pepper together increases the expression of defense-related genes in maize and its resistance to pathogens (Ding *et al.*, 2015). Thus, simply the presence of healthy plants can affect basal immunity and resistance to pathogens in neighbouring plants of another species. In the case of intraspecific interactions, it was shown that root exudates from Arabidopsis can modify the expression of defense-related genes in conspecific, genetically distinct plants (Biedrzycki *et al.*, 2011). Apart from this indirect evidence that intraspecific interactions modulate immunity, there is, to our knowledge, no direct evidence that signals emitted by healthy plants can modulate the susceptibility to pathogens or immunity in conspecific, genetically distinct neighbours. Establishing whether some conspecific neighbours rather than others enhance immunity and susceptibility to pathogens will clearly have important implications for designing varietal mixtures. Here, we designed a pioneering study aimed at determining whether intraspecific interactions with diseased or healthy neighbours can affect basal immunity and susceptibility to pathogens. We chose individual genotypes of rice and durum wheat as subjects to conduct greenhouse experiments in which plants were grown with various genetically different, conspecific neighbours. After identifying neighbours that affected susceptiblity in the plants in question, we measured their global impact on disease susceptibility and their capacity to modulate the expression of basal immunity genes, and evaluated the type of signal underlying the observed modifications.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

Materials and methods

Plant material, growth conditions, and experimental design

An overview of the experimental design is shown in Supplementary Fig. S1 and Supplementary Table S1.

We used the temperate rice (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) genotype Kitaake (KIT) and the durum wheat (*Triticum turgidum*) genotype Cultur (CUL) as the subjects on which we measured phenotypic responses. These are termed the 'focal' genotypes whilst other genotypes are termed 'neighbours'. In an initial trial, we examined the interactions of the two focal genotypes with nine others of the same species (Supplementary Tables S2, S3). All the genotypes had comparable levels of susceptibility to the pathogens that we used (Supplementary S1C; see below). KIT and CUL were grown in the presence of plants either of the same genotype (termed 'pure' conditions) or of a different genotype (mixture), giving 10 combinations in each species (1 pure + 9 mixture). As a result of this initial trial, we selected the rice cultivar Lido (LID) and the durum wheat cultivar Atoudur (ATO) as representative neighbours for further detailed examination.

For rice, plants were grown in plastic pots with one row of four focal plants and one row of four neighbours. The pots were 9×9×9.5 cm and filled with a substrate of 58% blond peat, 18% coconut powder, 10% perlite, 9% volcanic sand, and 5% clay, supplemented with 3.5 g l^{-1} of fertilizer (Basacote Native 6M, NPK 14-3-19). The plants were grown under a 16/8-h photoperiod with artificial light of 55 000 lumen at 27/23 °C. For wheat, plants were grown in plastic pots with one row of three focal plants and one row of three neighbours. The pots were 7×7×6 cm and filled with a substrate of 80% of N2 Neuhaus soil (ID 4020.20) and 20% pozzolan supplemented with 4.5 g l^{-1} fertilizer (Flocoat Polyon, NPK 17-7-27, Florenprodi, Paris). The plants were grown under a 16/8-h photoperiod with artificial light of 35 000 Lumen), at 24/20 °C. The equivalent population densities of ~1 plant per 10 cm^{-2}, which were about half those typically used in experiments (e.g. Berruyer *et al.*, 2003), and the high quantities of nutrients provided resulted in low levels of competition.

To test the relative impacts of inter- and intra-genotypic interactions, we also established pots in the same system of cultivation in which a single focal plant and a single neighbour of the same genotype were planted.

Soil sterilization, and below- and above-ground separation treatments

To examine the effects of the soil microbiota on neighbour-modulated susceptibility, we sterilized the soil by autoclaving the substrate for 1 h at 120°C before sowing and the addition of fertilizer. The results were compared with those of all the other experiments where non-autoclaved soil was used.

We examined the effects of completely separating the roots of the plants by placing a non-porous plastic membrane between the focal and neighbour plants. We also examined the effects of separating the roots of the focal and neighbour plants with a porous membrane (22–25 µm; Merck Miilipore) that prevented physical contact but allowed movement of water and chemicals.

We also performed experiments to separate the above-ground parts of the plants by placing paper bags over the neighbours (Supplementary Fig. S1A). There were two diseased-neighbour treatments of 'Neighbour inoculated' and 'Neighbour inoculated and covered', compared with a control where the neighbours were covered only whilst the inoculation procedure was being carried out to avoid them being infected ('Neighbour non-inoculated').

Pathogen material, inoculation procedure, and disease assessment

For rice, we selected the multivirulent strain CL26 (Gallet *et al.*, 2015) of the hemibiotrophic fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. The strain was grown for 10 d on rice flour agar medium (20 g of rice flour, 15 g of agar, 2.5 g of yeast extract, and 1 l of distilled water) under fluorescent light (alternating 3250 lumen white and 1400 purple neon lights) with a 12-h photoperiod at 26 °C. We harvested conidia by flooding the culture plates with 5 ml of sterile distilled water and filtering with a Miracloth 22–25 µm filter. Plants were inoculated at 3 weeks old. Trays containing 15 pots (i.e. 120 plants) were sprayed with 30 ml of a suspension of 100 000 conidia ml^{-1} (with 0.1% gelatin) as described by Berruyer *et al.* (2003), representing a rate of ~ 25000 conidia per plant.

We used the hemibiotrophic bacterial strain PXO99A of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* to inoculate all the individual rice plants by leaf clipping. The bacteria were cultivated for 2 d at 28 °C in the dark, in PSA medium (10 g peptone, 10 g sucrose, 1 g glutamic acid, 16 g agar, 1l H_2O). We performed leaf-clip inoculation on 4- to 5-week-old plants using a bacterial suspension with an OD_{600} of 0.2 and measured the size of lesions at 15 d post-inoculation (dpi) as described by Oliva *et al.* (2019).

We also inoculated rice with the necrotrophic fungus *Bipolaris oryzae* (De Vleesschauwer *et al.*, 2014), using the strain FR9037 isolated on rice in Camargue in the south of France. The strain was grown for 14 d on RFA (Rabbit Food Agar) medium (30 g l^{-1} agar, 100 g l^{-1} Forti Diet Pro Health, Kaytee) under the same culture conditions that are described above for *M. oryzae*, with a 12-h photoperiod at 25 °C (Hau and Rush, 1980). The conidia were harvested and filtration and inoculation were performed using the same protocol as for *M. oryzae*, at a rate of ~15000 conidia per plant.

We inoculated durum wheat plants with the causal agent of leaf rust, the biotrophic fungus *Puccinia* triticina (Bolton *et al.*, 2008), using a multivirulent field isolate from southern France. Because *P. triticina* is an obligatory biotroph, we harvested spores by aspiration from infected plants in a separate greenhouse and immediately froze them at −80 °C. To prepare the inoculum, a heat shock of 40 °C for 10 min was applied to the spores and they then were suspended in 1 ml of Tween 20 before diluting in 30 ml of water (with 0.1% gelatin). We used an average of 8 mg of spores to inoculate 144 plants by spraying (Ballini *et al.*, 2020).

We also inoculated durum wheat with the P1 isolate of the hemibiotrophic fungus *Zymoseptoria tritici* (synonym *Septoria tritici*) obtained from a durum wheat line Pescadou in 2015 in Montpellier, France. We cultivated the strain over 4–5 d under the same conditions that are described above for *M. oryzae*, except that the temperature was 20 °C, on YPD medium (yeast extract 10 g l^{-1}, bactopeptone 20 g l^{-1}, sucrose 20 g l^{-1}, agar 15 g l^{-1}). Spores were havested by flooding the culture plate with 5 ml of sterile distilled water, and one drop of Tween 20 was add for 10 ml of suspension. We performed inoculation with a solution of 10^6 spores ml^{-1} that was applied to the leaves of all the individual plants using a paintbrush (Kettles and Kanyuka, 2016).

In all cases, an inoculation solution (0.1% gelatin) without spores was used as a control.

After inoculation, the rice and wheat plants were incubated for 16 h in the dark in a controlled-climate chamber at 25 °C and 95% relative humidity, and then returned to normal growth conditions. At 6–7 d after inoculation (21 d for *Septoria* disease in wheat), we scanned the youngest fully-emerged leaf of 3–4 focal plants per pot (600 pixels per inch; Epson Perfection V370 Photo scanner). Abnormal plants were not scored. The images were analysed using the R package LeAFtool (Lesion Area Finding tool; https://github.com/sravel/LeAFtool), which measures leaf area and lesion number. The parameters used for the analysis were at least 10 000 pixels for leaves and 50 pixels for lesion areas, with the blur value at 1. To account for outliers and software errors, we manually removed from the analysis lesions that we considered to be of abnormal size. Leaf susceptibility was then estimated as the number of lesions cm^{-2} of leaf area (or percentage of leaf necrosis area for *X. oryzae* in rice and *Z. tritici* in wheat).

RNA extraction and RT-qPCR analysis

For gene expression studies, we used protocols described previously by Delteil *et al.* (2012). Frozen leaf tissues were ground in liquid nitrogen

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

and ~500 mgof powder was treated with 1 ml of TRIzol (Invitrogen). RNA samples (5 µg) were denatured for 5 min at 65 °C with oligo(dT) 18 (3.5 mM) and deoxynucleoside triphosphate (dNTP; 1.5 mM). They were then subjected to reverse transcription for 60 min at 37 °C with 200 U of reverse transcriptase M-MLV (Promega) in the appropriate buffer. The cDNA (5 µg, dilution 1:10) was then used for reverse-transcription quantitative (RT-q)PCR. The RT-qPCR mixtures contained PCR buffer, dNTP (0.25 mM), MgCl2 (2.5 mM), forward and reverse primers (final concentrations of 150, 300, or 600 nM), 1 U of HotGoldStar polymerase, and SYBR Green PCR mix according to the manufacturer's recommendations (Eurogentec, Seraing, Belgium). The genes examined and the primers used are given in Supplementary Tables S3, S4. Amplification was performed as follows: 95 °C for 10 min; 40 cycles of 95 °C for 15 s, 62 °C for 1 min, and 72 °C for 30 s; 95 °C for 1 min and 55 °C for 30 s. RT-qPCR was performed using a LightCycler480 instrument (Roche) and data were extracted using the accompanying software. The rice *actin* gene (*Os03g50890*) for and durum wheat *ubiquitin* gene (*CD921597*) were used as internal controls, and their expression levels did not vary significantly between treatments (Supplementary Fig. S2). The calculation of gene expression was performed using the measured efficiency for each primer pair as described by Vergne *et al.* (2007). The defense genes that we examined are proxies for basal immunity in rice (Vergne *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2017) and wheat (Duba *et al.*, 2018). The expression of genes was measured before inoculation and at different time-points afterwards depending on the pathogen infection cycle.

Statistical analyses

All analyses were performed using R (www.r-project.org). All experiments were repeated at least three times, and each experiment included at least four replicate pots for each focal/neighbour association, representing a total of 2964 plants for rice and 2340 for wheat. We used a linear model where the number of lesions per unit area of leaf in the focal plant was a function of the experiment effect, the position effect (placement of the pot in the experiment), and the genotypic identity of the neighbouring plant. This model was used to calculate least-square means (LSmeans) using the R package *lsmeans*. Square-root transformation was used to correct for normality and homocedasticity. The impact of the neighbour on a focal plant was tested by ANOVA followed by Dunnett's test (function *glht* in the R package *multcomp*). The 'pure' condition was used as the control group for Dunnett's tests. For gene expression, at least one of the distributions was not normal, and therefore we evaluated differences between treatments using non-parametric Wilcoxon's tests.

Results

Varietal mixtures affect disease susceptibility in the absence of pathogen propagation

We first evaluated the disease susceptibility of one focal plant genotype of each species in the presence of nine different conspecific neighbours. In durum wheat, the susceptibility to *P. triticina* of the focal genotype, Cultur (CUL), was significantly reduced by 30% in the presence of the neighbour genotype Atoudur (ATO) comapred with the control (CUL/CUL; Fig. 1A). In rice, the susceptibility to *M. oryzae* of the focal genotype, Kitaake (KIT) was significantly reduced by 32% in the presence of the neighbour genotype, Lido (LID) and by 27% in the presence of Luxor (LUX) compared with the KIT/KIT control (Fig. 1B). We therefore selected the wheat CUL/ATO and rice KIT/LID focal/neighbour mixtures as models for further experiments.

In addition to inter-genotypic interactions between focal and neighbour plants, intra-genotypic interactions within focal plants could also occur in our experimental system. We tested this possibility by comparing susceptibility levels in our standard design (three focal plants plus three neighbour plants for wheat, four plus four plants for rice) with the situation where only inter-genotypic interactions could occur (i.e. one focal plant with one neighbour plant only). We observed no differences in the response of susceptibility triggered by the neighbour between the two designsdesigns (Supplementary Fig. S3), suggesting that the reduction of susceptibility that we observed in our standard design (Fig. 1) was only due to inter-genotypic interactions.

Varietal mixtures have a broad impact on disease susceptibility

We tested the impact of the model mixtures CUL/ATO and KIT/LID on susceptiblity to different pathogens displaying contrasting lifestyles. As expected, compared with the controls, both model mixtures displayed reductions of susceptibility in focal plants when inoculated with the pathogens that were used in the initial test: in wheat susceptibility to the biotrophic *P. triticina* was reduced by 11% in CUL (Fig. 2A) while in rice susceptibility to the hemibiotrophic *M. oryzae* was reduced by

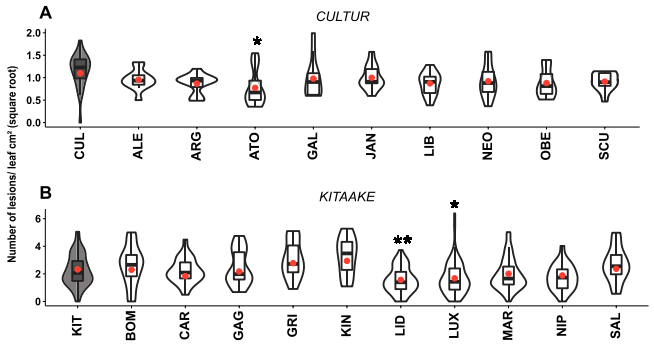


Fig. 1. Disease susceptibility of durum wheat and rice in intraspecific mixtures. (A) Plants of the wheat genotype Cultur (CUL) and (B) the temperate *japonica* rice genotype Kitaake (KIT) were grown with neighbours of the same genotype (grey shading, 'pure' condition) or of a conspecific genotype (white shading, mixture), and the plants were inoculated with *Puccinia triticina* (leaf rust disease) for wheat and *Magnaporthe oryzae* (blast disease) for rice (see Methods). For genotype abbreviations see Supplementary Tables S2 and S3. Susceptibility was measured as the number of lesions cm^{-2} of leaf area on the CUL and rice KIT focal plants (data are square-root transformed). The violin plots represent at least n=42 plants for rice and n=36 plants for wheat. The red dots represent the least-square means as determined using a linear model. For wheat, each combination was performed eight times in three separate experiments, and for rice, each combination was performed 12 times in three separate experiments. Significant differences compared with the 'pure' control were determined using ANOVA of the linear model followed by Dunnett's tests: *P<0.05; **P<0.01.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

34% in KIT (Fig. 2C). In contrast, wheat susceptibility to the hemibiotrophic fungal pathogen *Z. tritici* was increased by 14% in the mixture compared to the pure condition (Fig. 2B). For the rice KIT/LID mixture, we tested the hemibiotrophic bacterial pathogen *X. oryzae* and the necrotrophic fungal pathogen *B. oryzae*. While susceptiblity to *X. oyzae* was not affected in KIT (Supplementary Fig. S4A), the susceptibility to *B. oryzae* increased by 46% when KIT plants were grown in the presence of LID conspecific plants (Fig. 2D).

In our experimental system, susceptibility could be evaluated for each member of the pair of genotypes. We therefore examined whether the observed changes in pathogen susceptibility in the CUL and KIT focal plants were associated with changes in susceptibility in their respective ATO and LID neighbour plants. In wheat, both components of the pair showed reduced susceptibility to *P. triticina* (Fig. 2A, Supplementary Fig. S5A) and increased susceptibility to *Z. tritici* (Fig. 2B, Supplementary Fig. S5B). In rice, both members of the pair showed reduced susceptibility to *M. oryzae* (Fig. 2C, Supplementary Fig. S5C) and increased susceptibility to *B. oryzae* (Fig. 2D, Supplementary Fig. S5D). The susceptibility of rice to the bacterial pathogen *X. oryzae* was marginally reduced in LID in the pair KIT/LID (Supplementary Fig. S4B). Thus, both members of the pairs were generally affected by being in mixtures, and opposite effects on disease susceptibility could occur.

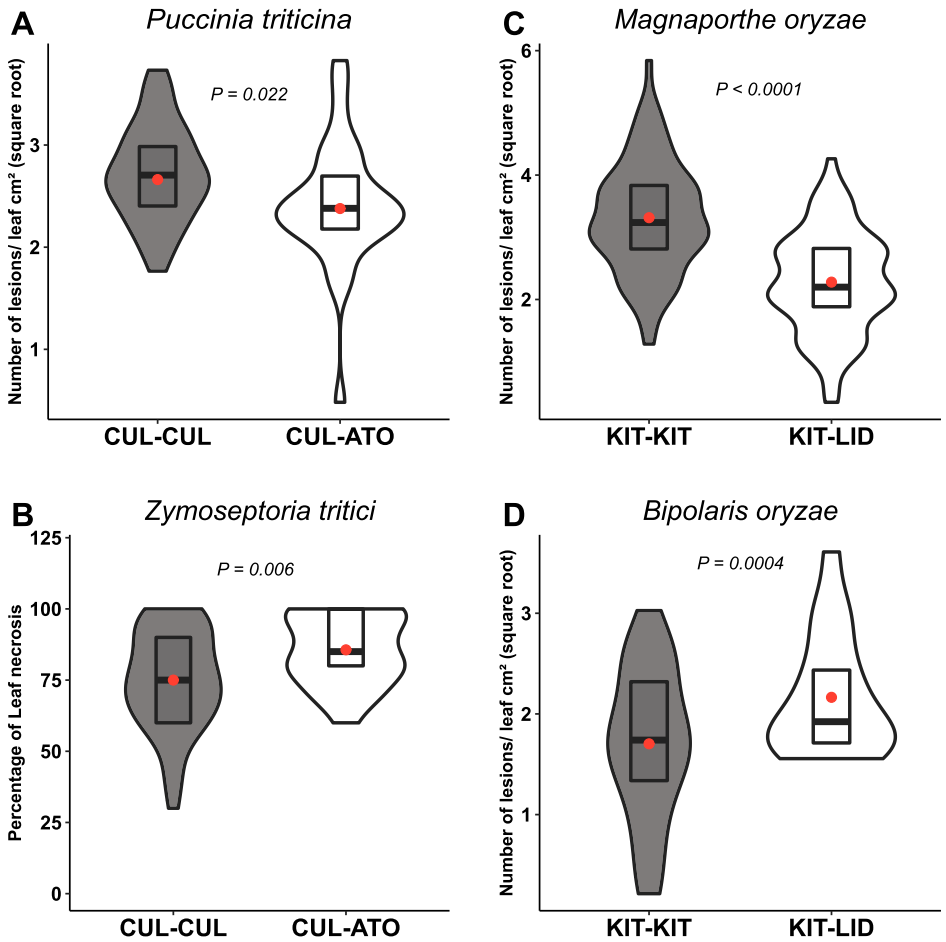


Fig. 2. Impact of conspecific mixtures of durum wheat and rice genotypes on disease susceptibility to different fungal pathogens. (A, C) Plants of the wheat genotype Cultur were grown either with itself (CUL-CUL, 'pure' condition) or with the genotype Atoudur (CUL-ATO), and (B, D) plants of the temperate *japonica* rice genotype Kitaake were grown either with itself (KIT-KIT, 'pure') or with the genotype Lido (KIT-LID). The plants were inoculated with the fungal pathogens as indicated (see Methods). *Puccinia triticina* is a biotrophic fungus whlist *Zymoseptoria tritici*, *Magnaporthe oryzae*, and *Biopolris oryzae* are all hemibiotrophic. All measurements were made on the CUL and KIT focal plants. Susceptibility was measured as the number of lesions cm^{-2} of leaf area (data are square-root transformed), except for *Z. tritici* were it was measured as percentage of leaf necrosis. The violin plots represent at least *n*=42 plants for rice and *n*=36 plants for wheat. The red dots represent the least-square means as determined using a linear model. The data represent at least three experiments of four and six replicates for wheat and rice, respectively. Significant differences were determined using ANOVA followed by Dunnett's tests of the linear model. The corresponding data with ATO and LID as the focal plants are given in Supplementary Fig. S5.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

Requirements for triggering changes in susceptibility in varietal mixtures

The plant–plant interactions behind the changes in susceptibility that we observed in the wheat CUL/ATO and rice KIT/LID model mixtures could have taken place above and/or below ground. In addition, it was also possible that inoculation of the neighbour plants could have been required to trigger the changes in susceptibility of the focal plants. To address these questions, we set up experiments where we limited or abolished physical contact between the roots, the presence of soil microbiota, or the transfer of a signal by the neighbours. We examined inoculation with *P. triticina* in wheat and with *M. oryzae* in rice.

The reduction of susceptibility induced by neighbours in the rice and wheat mixtures remained significant when the soil had been autoclaved prior to sowing (Fig. 3). In contrast, placing a non-porus plastic membrane in the soil between the focal and neighbour plants removed the changes in disease susceptibility in both the wheat and rice mixtures. Finally, placing a porous membrane between the plants did not modify the changes in susceptibility in the the KIT/LID mixture (Fig. 3B) whereas it removed them in the CUL/ATO mixture (Fig. 3A).

The changes in susceptibility in the focal plants were not modified when infection of the neighbour plants was prevented by covering them during inoculation (Fig. 4), and no differences were observed between having healthy and inoculated neighbours. In addition, there was no effect when a cover was placed over the neighbours after inoculation.

Varietal mixtures affect the expression of basal immunity

We examined whether the changes in susceptibility in the CUL/ATO and KIT/LID mixtures were associated with changes in the expression of basal immunity genes before or after inoculation. The expression data for CUL and KIT as focal plants are shown in Fig. 5 and the reciprocal data for ATO and LID as focal plants are provided in Supplementary Fig. S6.

For the wheat CUL and ATO genotypes, no significant differences in the expression of defense genes were found between the pure and mixture conditions before inoculation. After inoculation, *TtNOD* and *TtPR4* were significantly less induced at 48 h in CUL focal plants in the mixture than in CUL plants grown in the pure condition. Interestingly, the opposite pattern was found at 48 h after infection in the ATO plants in the ATO/CUL mixture.

For the rice KIT/LID mixture before inoculation, *OsPBZ1* and *OsPR1B* had marginally higher expression ($P<0.1$) in the KIT plants, and *OsPBZ1* had significantly higher expression in

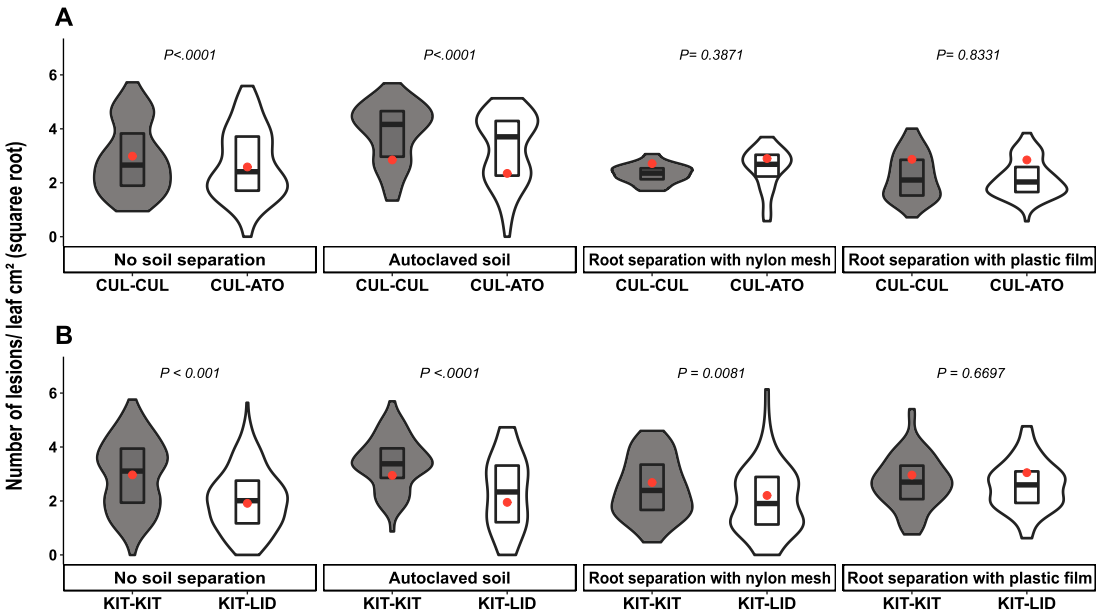


Fig. 3. Effects of soil sterilization and root separation on disease susceptibility of durum wheat and rice genotypes grown in different conspecific mixtures. (A) Plants of the wheat genotype Cultur were grown either with itself (CUL-CUL, 'pure' condition) or with the genotype Atoudur (CUL-ATO) and were inoculated with *Puccinia triticina*. (B) Plants of the temperate *japonica* rice genotype Kitaake were grown either with itself (KIT-KIT, 'pure') or with the genotype Lido (KIT-LID) and inoculated with *Magnaporthe oryzae*. Susceptibility was measured as the number of lesions cm^{-2} of leaf area on the CUL and rice KIT focal plants (data are square-root transformed). The plants were grown in normal soil without any root separation, in autoclaved soil without any root separation, in normal soil with roots separated by a porous nylon mesh, and in normal soil with roots separated by a non-porous plastic film (see Methods). The violin plots represent at least n=42 plants for rice and n=36 plants for wheat. The red dots represent the least-square means as determined using a linear model. For wheat, each combination was performed eight times in three separate experiments, and for rice, each combination was performed 12 times in three separate experiments. Significant differences were determined using ANOVA of the linear model followed by Dunnett's tests.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

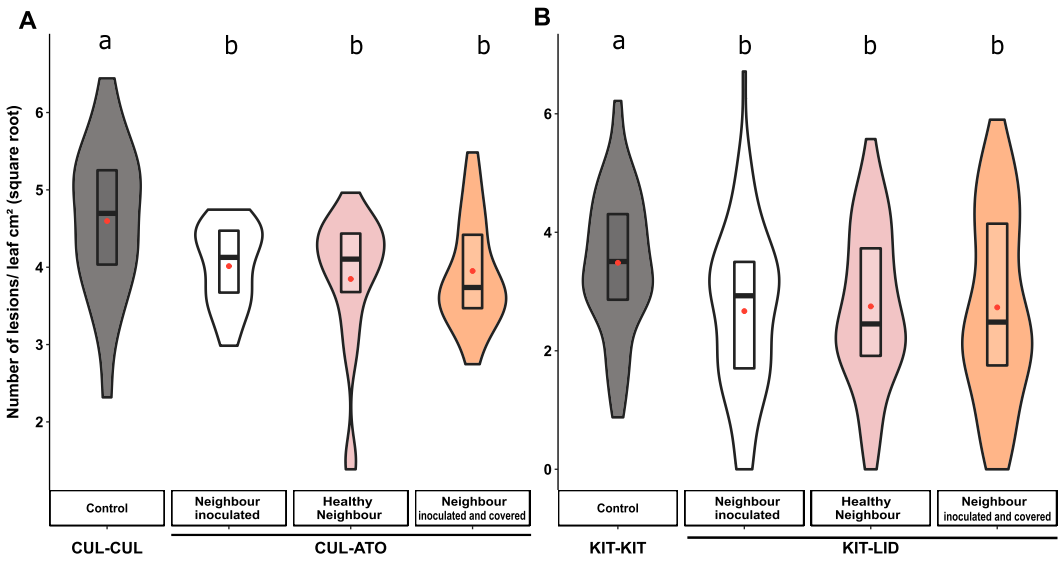


Fig. 4. Effects of healthy and diseased neighbours on disease susceptibility of durum wheat and rice genotypes grown in different conspecific mixtures. (A) Plants of the wheat genotype Cultur were grown either with itself (CUL-CUL, 'pure' condition) or with the genotype Atoudur (CUL-ATO) and were inoculated with *Puccinia triticina*. (B) Plants of the temperate *japonica* rice genotype Kitaake were grown either with itself (KIT-KIT, 'pure') or with the genotype Lido (KIT-LID) and inoculated with *Magnaporthe oryzae*. Susceptibility was measured as the number of lesions cm^{-2} of leaf area on the CUL and rice KIT focal plants (data are square-root transformed). In each case, plants were also grown with inoculated neighbours that were covered to limit aerial contact (see Methods). The violin plots represent at least n=42 plants for rice and n=36 plants for wheat. The red dots represent the least-square means as determined using a linear model. For wheat, each combination was performed eight times in three separate experiments, and for rice, each combination was performed 12 times in three separate experiments. Different letters indicate significant differences as determined using ANOVA followed by Tukey's HSD tests of the linear model (P<0.05).

the LID plants. After inoculation, a significant increase in expression was observed in the KIT plants for *OsPBZ1* at both 24 h and 96 h after inoculation and for *OsPR1B* at 96 h in the KIT/LID mixture for KIT plants. No significant differences were found for the LID plants.

Discussion

Our results show direct evidence that, for the two crop species examined, varietal mixtures can constitutively modify plant susceptibility to various foliar pathogens, both intrinsically and independently of pathogen propagation, and as a consequence of inter-genotypic, conspecific plant–plant interactions. The major phenotypical changes that we observed were accompanied by some transcriptional changes in genes related to the immune response, although these were limited. Moreover, we show that a signal from healthy neighbours is involved, probably below-ground, suggesting that the shade avoidance syndrome is not involved here. To date, constitutive plant–plant interactions have been shown to affect disease susceptibility in interspecific mixes (Zhu and Morel, 2019; Pélissier *et al.*, 2021), and our experiments provides the groundwork for studying this phenomenon in intraspecific mixes. We propose that these phenomenoa in response to pathogens be termed plant 'neighbour-modulated susceptibility' (NMS), by analogy with microbiota-modulated immunity (MMI; (Vannier *et al.*, 2019)). Here, we found that intraspecific NMS was present in 10–20% of the cases examined (Fig. 1), demonstrating that the genetic identity of the neighbours matters. This opens the possibility for conducting genetic analyses of intraspecific NMS, a promising approach for discovering the genes underlying these plant–plant interactions. For instance, testing the effect of a wide range of genotyped neigbours on one given focal plant could lead to identification of the genes involved in the triggering of NMS.

There are numerous reports of changes in susceptibility to insects following plant–plant interactions in intraspecific mixtures (e.g. Heil and Karban, 2010), but data remain scarce for pathogen susceptibility. Furthermore, most previous studies have required prior inoculation of the neighbours to induce changes in the focal plant. For instance, it has recently been shown that Arabidopsis plants infected with a bacterial pathogen produce an aerial signal that is translocated onto uninfected neighbours and primes their defenses, leading to reduced susceptibility (Wenig *et al.*, 2019). In our experimental system, there was no difference in NMS for plants with either healthy or inoculated neighbours (Fig. 4). This demonstrates that changes in susceptibility in intraspecific plant mixtures does not require inoculation of the neighbour, and thus does not depend on the neighbour's susceptiblity level, and hence expression of immunity can be constitutive. In that respect, NMS does not resemble the many cases of 'eavesdropping' situations reported so far (Rebolleda-Gómez and Wood, 2019).

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

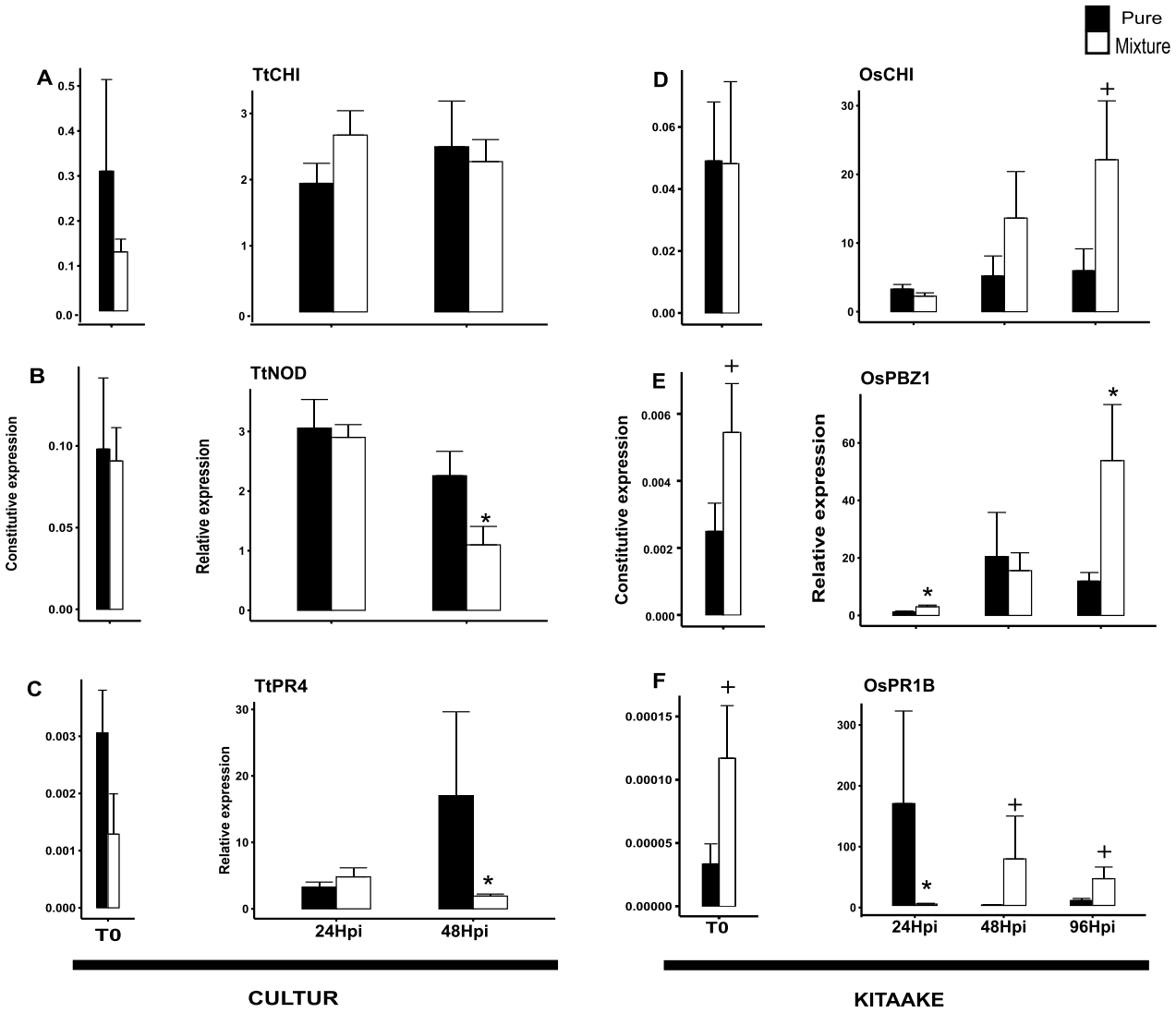


Fig. 5. Expression of immunity-related genes in response to fungal pathogens in durum wheat and rice genotypes grown in different conspecific mixtures. (A–C) Plants of the wheat genotype Cultur were grown either with itself ('pure' condition) or with the genotype Atoudur (mixture) and were inoculated with *Puccinia triticina*. (D–F) Plants of the temperate *japonica* rice genotype Kitaake were grown either with itself ('pure') or with the genotype Lido (mixture) and inoculated with *Magnaporthe oryzae*. The 'pure' condition and the mixtures are as indicated in the key. Tt, durum wheat (*Triticum turgidum*); Os, rice (*Oryza sativa*). Gene expression was measured in leaves before infection (T0) and at 24 h post-inoculation (hpi) and 48 hpi for wheat, and at 24, 48, and 96 hpi for rice. Expression was determined by RT-qPCR and normalized using the *actin* and *ubiquitin* genes for rice and wheat, respectively. The constitutive expression is shown for T0, and for the subsequent time-points expression is relative to that at T0 (i.e. ratio of inoculated/non-inoculated). Data are means (SE) of at least n=6 replicates. Significant differences between the 'pure' conditions and the mixtures were determined using Wilcoxon tests: $^{+}P<0.1$; $^{*}P<0.05$. The corresponding data with Atoudur and Lido as the focal plants are given in Supplementary Fig. S6.

While several studies have examined changes in expression of genes related to immunity within interspecific plant–plant interactions (Zhu and Morel, 2019; Pélissier *et al.*, 2021), data are currently scarce and indirect for intraspecific interactions (Biedrzycki *et al.*, 2011). Our results showed that intraspecific plant–plant interactions can modify the expression of defense genes, both before and after pathogen attack. This was particularly evident in the rice KIT genotype in the KIT/LID mixture (Fig. 5D–F). The expression of *OsCHI* was not affected in a constitutive manner but only after infection, while expression of *OsPR1b* and *OsPBZ1* was increased by 2–3-fold before infection and by 3–30-fold after infection. This suggests that defense had been primed (Martinez-Medina *et al.*, 2016) by the presence of neighbours and not just constitutively enhanced. The hypothesis can be made that the effects of the plant–plant interactions on susceptibility resulted from some of the observed changes in gene expression. For instance, in rice the LID neighbour induced the expression of the *OsPBZ1* and *OsPR1B* defense genes in the KIT focal plants. The expression of these two genes has been shown to correlate with

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

the hypersensitive response (Takahashi *et al.*, 1999), which is known to promote the development of necrotrophic pathogens (van Kan, 2006; Mengiste, 2012) and to reduce the development of hemibiotrophic ones (Jia *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2018). This is consistent with the increased susceptibility to *B. oryzae* and the reduced susceptibility to *M. oryzae* that we observed in rice mixtures (Fig. 2C, D). More generally, the fact that pathogens with different lifestyles were affected in opposite ways by the plant–plant interactions in our study indicates a role of immunity in intraspecific NMS. Indeed, several defense pathways controlled by different defense hormones can have antagonistic effects on infection depending on the lifestyle of the pathogen (De Vleesschauwer *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2016). However, the fact that the susceptibility of rice genotypes to *X. oryzae* was affected in an opposite way to *M. oryzae* (Fig. 2C, D) and that the expression of durum wheat defense genes was only weakly affected, and even reduced when plants were grown in mixtures (Fig. 5A–C, Supplementary Fig. S6A–C), suggests that immunity was not the only driver of NMS. These observations highlight the need for further investigation of the molecular physiology of varietal mixtures. Measurements of defense hormones and more exhaustive transcriptomic analyses are required in order to understand the overall impact of intraspecific plant–plant interactions on plant physiology.

Modifications of the susceptibility responses to pathogens driven by plant–plant interactions can be caused by above- and/or below-ground signalling processes (Zhu and Morel, 2019; Pélissier *et al.*, 2021). The experiments that we designed to examine the requirements for intraspecific NMS showed that the interactions were located in the soil (Fig. 3), although with slightly different responses between rice and wheat. Indeed, NMS required direct root contact in the case of wheat but not in the case of rice mixtures. NMS did not require the presence of microbiota in the soil for either species (Fig. 3), although we cannot exclude the possible effects of microbiota transferred to the sterilized soil by the seeds or through the air during the experiments.

The mechanisms that trigger intraspecific NMS in focal plants are still unknown. In mixtures of tree species, plant competition induces a reduction of aerial biomass and an increase in defenses, such as phenolic or terpenoid contents (Donaldson *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2016). Thus, plant–plant interactions could indirectly affect susceptibility to pathogens because of a putative trade-off between growth (subsequent to competition) and defense (Huot *et al.*, 2014; Karasov *et al.*, 2017). Chemical signals exchanged in the soil could also be involved in triggering NMS, and have been identified as being the cause of modifications in susceptibility in interspecific plant–plant interactions (Subrahmaniam *et al.*, 2018; Zhu and Morel, 2019; Pélissier *et al.*, 2021). However, there is only indirect evidence to suggest that molecules secreted in root exudates modify plant immunity in intraspecific mixtures (Biedrzycki *et al.*, 2011). One such chemical signal in rice could be allantoin, which is produced by roots and is involved in kin recognition (Yang *et al.*, 2018). Moreover, its production and excretion into the soil can vary depending on the rice genotype (Wang *et al.*, 2007). In wheat, the response to plant competition is commonly measured by the amount of production of DIMBOA, a secondary metabolite (Kong *et al.*, 2018), and since its by-products can activate genes related to stress and defense in Arabidopsis (Venturelli *et al.*, 2015), it represents a good candidate for future studies. Electrical signals have also been shown to be involved in plant root interactions (Volkov *et al.*, 2019) and hence might be worthy of investigation.

Varietal mixtures, resulting from mixing several cultivars of the same species, can reduce disease in crop fields (Mundt, 2002). To date, the positive effects observed in the field have been attributed to epidemiological mechanisms that mostly result from the increase in functional diversity (Garrett and Mundt, 1999; Gaba *et al.*, 2015). Our discovery of neighbour-modulated susceptibility (NMS) suggests that disease reduction in intraspecific mixtures can also result from direct plant–plant interactions, which probably act in parallel with and independently of the other field-scale mechanisms that occur. NMS could provide a new approach to deciding how varieties are mixed and hence how diseases can be managed in agriculture. However, many questions regarding NMS renain to be answered, including whether it lasts throughout the lifespan of the plant, what (if any) is its quantitative contribution to limiting diseases in the field, and can it be manipulated to avoid adverse effects whilst utilizing its positive effects on disease resistance?

Supplementary data

The following supplementary data are available at *JXB* online.

Fig. S1. Summary of experimental design and examples of leaf symptoms observed.

Fig. S2 Expression of housekeeping genes before and after inoculation of plants.

Fig. S3. Effects of intra- and inter-genotypic plant–plant interactions on disease susceptibility in rice and wheat.

Fig. S4. Responses of selected intra-specific mixtures of rice on disease susceptibility to *Xanthomonas oryzae*.

Fig. S5. Effects of different pathogen lifestyles on responses of disease susceptibility in selected intra-specific mixtures in rice and wheat.

Fig. S6. Expression of immunity-related genes in the wheat ATO genotype and the rice LID genotype when they were the focal plants (reciprocal data for Fig. 5).

Table S1. Summary of the experimental treatments and the outcomes observed.

Table S2. List of durum wheat genotypes used in the study.

Table S3. List of the rice genotypes used in the study.

Table S4. List of durum wheat genes examined in this study.

Table S5. List of rice genes examined in this study.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

Acknowledgements

We thank H. Adreit and H. Kabore for their kind help with the *Bipolaris* inoculations. This is a publication from the AMUSER project funded by Montpellier Université d'excellence (I-Site MUSE). RP is supported by a PhD grant from Institut Agro. CV was supported by the European Research Council (ERC) Starting Grant Project 'Ecophysiological and biophysical constraints on domestication in crop plants' (Grant ERC-StG-2014-639706-CONSTRAINTS). We thank the reviewers for their constructive comments.

Author contributions

RP, BL, BE, FF, VC and JBM were responsible for conceptualization and writing; RP and BL were responsible for data curation and formal analysis; JBM and VC were responsible for fFunding acquisition and project administration; RP, TC, AB, and BL were responsible fot the methodology.

Data availability

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author, Jean-Benoit Morel, upon request.

References

Ali S, Ganai BA, Kamili AN, *et al.* 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. Microbiological Research **212–213**, 29–37.

Ballaré CL, Pierik R. 2017. The shade-avoidance syndrome: multiple signals and ecological consequences. Plant, Cell & Environment **40**, 2530–2543.

Ballini E, Tavaud M, Ducasse A, *et al.* 2020. Genome wide association mapping for resistance to multiple fungal pathogens in a panel issued from a broad composite cross-population of tetraploid wheat *Triticum turgidum*. Euphytica **216**, 92.

Barot S, Allard V, Cantarel A, Enjalbert J, Gauffreteau A, Goldringer I, Lata J-C, Le Roux X, Niboyet A, Porcher E. 2017. Designing mixtures of varieties for multifunctional agriculture with the help of ecology. A review. Agronomy for Sustainable Development **37**, 13.

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH, Tharreau D. 2003. Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*. Theoretical and Applied Genetics **107**, 1139–1147.

Biedrzycki ML, Venkatachalam L, Bais HP. 2011. Transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* plants in response to kin and stranger recognition. Plant Signaling & Behavior **6**, 1515–1524.

Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF. 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. Molecular Plant Pathology **9**, 563–575.

Burdon JJ, Barrett LG, Rebetzke G, Thrall PH. 2014. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. Evolutionary Applications **7**, 609–624.

Chen BJW, Hajiboland R, Bahrami-Rad S, Moradtalab N, Anten NPR. 2019. Presence of belowground neighbors activates defense pathways at the expense of growth in tobacco plants. Frontiers in Plant Science **10**, 751.

Cheol Song G, Sim HJ, Kim SG, Ryu CM. 2016. Root-mediated signal transmission of systemic acquired resistance against above-ground and below-ground pathogens. Annals of Botany **118**, 821–831.

De Vleesschauwer Ap, Xu J, Höfte M. 2014. Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to Arabidopsis. Frontiers in Plant Science **5**, 611.

Delteil A, Blein M, Faivre-Rampant O, Guellim A, Estevan J, Hirsch J, Bevitori R, Michel C, Morel J-B. 2012. Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. Molecular Plant Pathology **13**, 72–82.

Ding L-N, Yang G-X, Yang R-Y, Cao J, Zhou Y. 2016. Investigating interactions of salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways in monocots wheat. Physiological and Molecular Plant Pathology **93**, 67–74.

Ding X, Yang M, Huang H, Chuan Y, He X, Li C, Zhu Y, Zhu S. 2015. Priming maize resistance by its neighbors: activating 1,4-benzoxazine-3-ones synthesis and defense gene expression to alleviate leaf disease. Frontiers in Plant Science **6**, 830.

Donaldson JR, Kruger EL, Lindroth RL. 2006. Competition- and resource-mediated tradeoffs between growth and defensive chemistry in trembling aspen (*Populus tremuloides*). New Phytologist **169**, 561–570.

Duba A, Goriewa-Duba K, Wachowska U. 2018. A review of the interactions between wheat and wheat pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp. and *Parastagonospora nodorum*. International Journal of Molecular Sciences **19**, 1138.

Fan J, Bai P, Ning Y, *et al.* 2018. The monocot-specific receptor-like kinase SDS2 controls cell death and immunity in rice. Cell Host & Microbe **23**, 498–510.e5.

Fernandez C, Monnier Y, Santonja M, Gallet C, Weston LA, Prévosto B, Saunier A, Baldy V, Bousquet-Mélou A. 2016. The impact of competition and allelopathy on the trade-off between plant defense and growth in two contrasting tree species. Frontiers in Plant Science **7**, 594.

Gaba S, Lescourret F, Boudsocq S, *et al.* 2015. Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. Agronomy for Sustainable Development **35**, 607–623.

Gallet R, Fontaine C, Bonnot F, Milazzo J, Tertois C, Adreit H, Ravigné V, Fournier E, Tharreau D. 2015. Evolution of compatibility range in the rice–*Magnaporthe oryzae* system: an uneven distribution of R genes between rice subspecies. Phytopathology **106**, 348–354.

Garrett KA, Mundt CC. 1999. Epidemiology in mixed host populations. Phytopathology **89**, 984–990.

Hau FC, Rush MC. 1980. A system for inducing sporulation of *Bipolaris oryzae*. Plant Disease **64**, 788–789.

Heil M, Karban R. 2010. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. Trends in Ecology & Evolution **25**, 137–144.

Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. 2014. Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. Molecular Plant **7**, 1267–1287.

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO Journal **19**, 4004–4014.

Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. Nature **444**, 323–329.

Karasov T, Chae E, Herman J, Bergelson J. 2017. Mechanisms to mitigate the tradeoff between growth and defense. The Plant Cell **29**, 666–680.

Karban R, Baldwin IT, Baxter KJ, Laue G, Felton GW. 2000. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. Oecologia **125**, 66–71.

Karban R, Shiojiri K, Huntzinger M, McCall AC. 2006. Damage-induced resistance in sagebrush: volatiles are key to intra- and interplant communication. Ecology **87**, 922–930.

Kettles GJ, Kanyuka K. 2016. Dissecting the molecular interactions between wheat and the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. Frontiers in Plant Science **7**, 508.

Kong CH, Zhang SZ, Li YH, Xia ZC, Yang XF, Meiners SJ, Wang P. 2018. Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. Nature Communications **9**, 3867.

Kristoffersen R, Jørgensen LN, Eriksen LB, Nielsen GC, Kiær LP. 2020. Control of *Septoria tritici* blotch by winter wheat cultivar mixtures: meta-analysis of 19 years of cultivar trials. Field Crops Research **249**, 107696.

Martinez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse CMJ, Pozo MJ, Ton J, van Dam NM, Conrath U. 2016. Recognizing plant defense priming. Trends in Plant Science **21**, 818–822.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

Mengiste T. 2012. Plant immunity to necrotrophs. Annual Review of Phytopathology **50**, 267–294.

Mundt CC. 2002. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. Annual Review of Phytopathology **40**, 381–410.

Ninkovic V, Rensing M, Dahlin I, Markovic D. 2019. Who is my neighbor? Volatile cues in plant interactions. Plant Signaling & Behavior **14**, 1634993.

Nobori T, Tsuda K. 2019. The plant immune system in heterogeneous environments. Current Opinion in Plant Biology **50**, 58–66.

Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, *et al.* 2019. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. Nature Biotechnology **37**, 1344–1350.

Pélissier R, Violle C, Morel JB. 2021. Plant immunity: good fences make good neighbors? Current Opinion in Plant Biology **62**, 102045.

Peng Y, van Wersch R, Zhang Y. 2017. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. Molecular Plant-Microbe Interactions **31**, 403–409.

Raboin LM, Ramanantsoanirina A, Dusserre J, Razasolofonanahary F, Tharreau D, Lannou C, Sester M. 2012. Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. Plant Pathology **61**, 1103–1111.

Rebolleda-Gómez M, Wood CW. 2019. Unclear intentions: eavesdropping in microbial and plant systems. Frontiers in Ecology and Evolution **7**, 385.

Schmid C, Bauer S, Müller B, Bartelheimer M. 2013. Belowground neighbor perception in *Arabidopsis thaliana* studied by transcriptome analysis: roots of *Hieracium pilosella* cause biotic stress. Frontiers in Plant Science **4**, 296.

Schuman MC, Allmann S, Baldwin IT. 2015. Plant defense phenotypes determine the consequences of volatile emission for individuals and neighbors. eLife **4**, e04490.

Stenberg JA. 2017. A conceptual framework for integrated pest management. Trends in Plant Science **22**, 759–769.

Subrahmaniam HJ, Libourel C, Journet EP, Morel JB, Muños S, Niebel A, Raffaele S, Roux F. 2018. The genetics underlying natural variation of plant–plant interactions, a beloved but forgotten member of the family of biotic interactions. The Plant Journal **93**, 747–770.

Takahashi A, Kawasaki T, Henmi K, Shil K, Kodama O, Satoh H, Shimamoto K. 1999. Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. The Plant Journal **17**, 535–545.

Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature **418**, 671–677.

van Kan JAL. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. Trends in Plant Science **11**, 247–253.

Vannier N, Agler M, Hacquard S. 2019. Microbiota-mediated disease resistance in plants. PLoS Pathogens **15**, e1007740.

Venturelli S, Belz RG, Kämper A, *et al.* 2015. Plants release precursors of histone deacetylase inhibitors to suppress growth of competitors. The Plant Cell **27**, 3175–3189.

Vergne E, Ballini E, Marques S, *et al.* 2007. Early and specific gene expression triggered by rice resistance gene *Pi33* in response to infection by *ACE1* avirulent blast fungus. New Phytologist **174**, 159–171.

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D, Nottéghem JL, Morel JB. 2010. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. BMC Plant Biology **10**, 206.

Volkov AG, Toole S, WaMaina M. 2019. Electrical signal transmission in the plant-wide web. Bioelectrochemistry **129**, 70–78.

Wang P, Kong CH, Hu F, Xu XH. 2007. Allantoin involved in species interactions with rice and other organisms in paddy soil. Plant and Soil **296**, 43–51.

Wenig M, Ghirardo A, Sales JH, *et al.* 2019. Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. Nature Communications **10**, 3813.

Yang XF, Li LL, Xu Y, Kong CH. 2018. Kin recognition in rice (*Oryza sativa*) lines. New Phytologist **220**, 567–578.

Zhu S, Morel JB. 2019. Molecular mechanisms underlying microbial disease control in intercropping. Molecular Plant-Microbe Interactions **32**, 20–24.

Zhu Y, Chen H, Fan J, *et al.* 2000. Genetic diversity and disease control in rice. Nature **406**, 718–722.

Downloaded from https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erab277/6298513 by guest on 27 August 2021

Supplementary informations

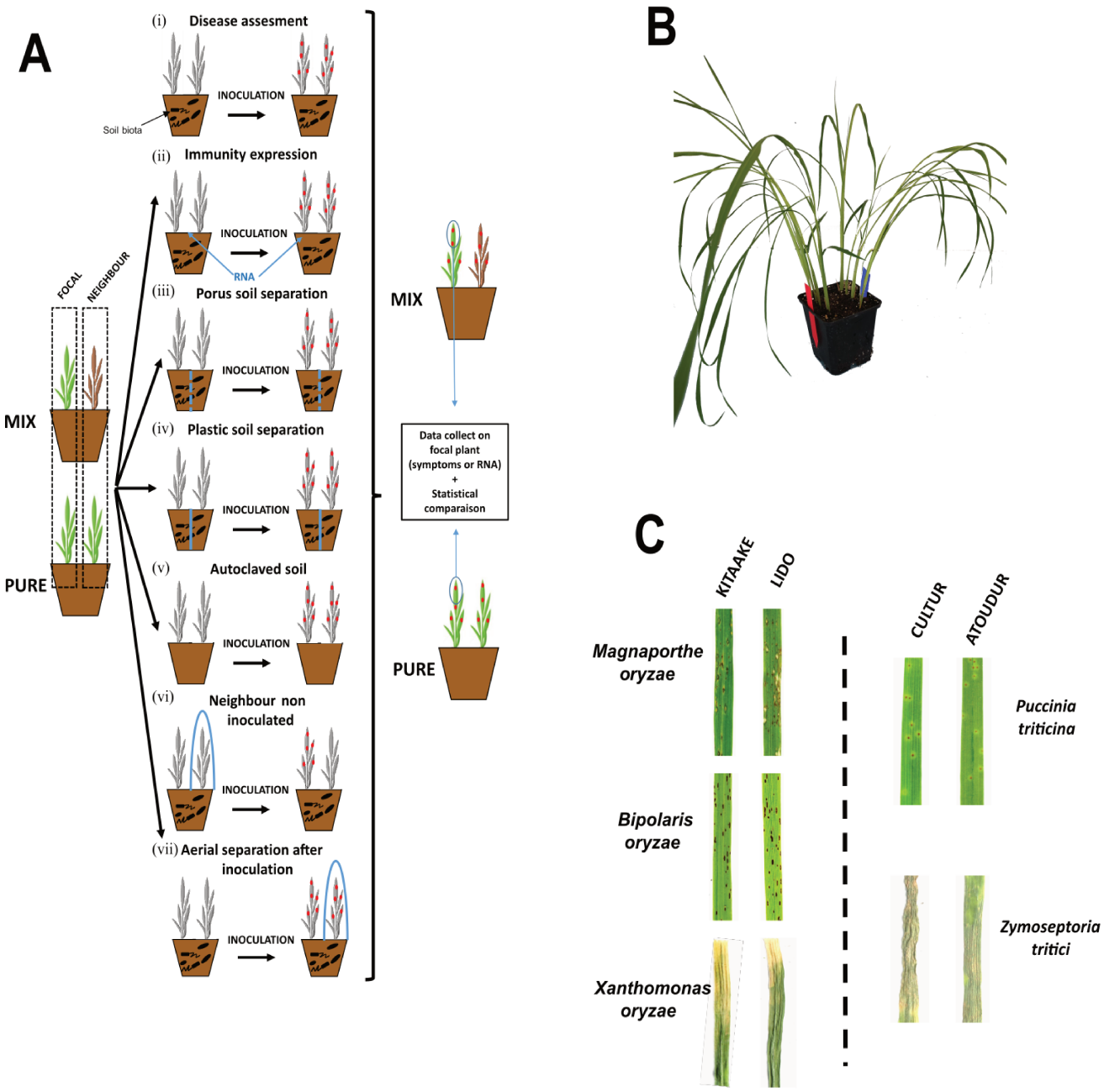


Fig. S1 Overall experimental design used in this study.

(A). Two model mixtures (KITAAKE/LIDO for rice and CULTUR/ATOUDUR for wheat) were selected. Each mixture and pure condition was used for several measurements and treatments: (i) Disease assessment with various pathogens, (ii) RNA harvesting for analysis of defense gene expression before and after inoculation, (iii) porus soil separation, (iv) plastic soil separation, (v) autoclaved soil, (vi) non inoculation of the neighour and (vii) aerial separation after inoculation between focal and neighbour. For all the experiments, symptoms (e.g number of lesions) or RNA were analyzed on the last developed leaf of the focal plant. Results of the focal pla nt in pure and mix condition were compared with the appropriate statistics.

(B). Example of set-up with two rice lines of plant used in one pot.

(C) Examples of leaf symptoms quantified by the pathogens

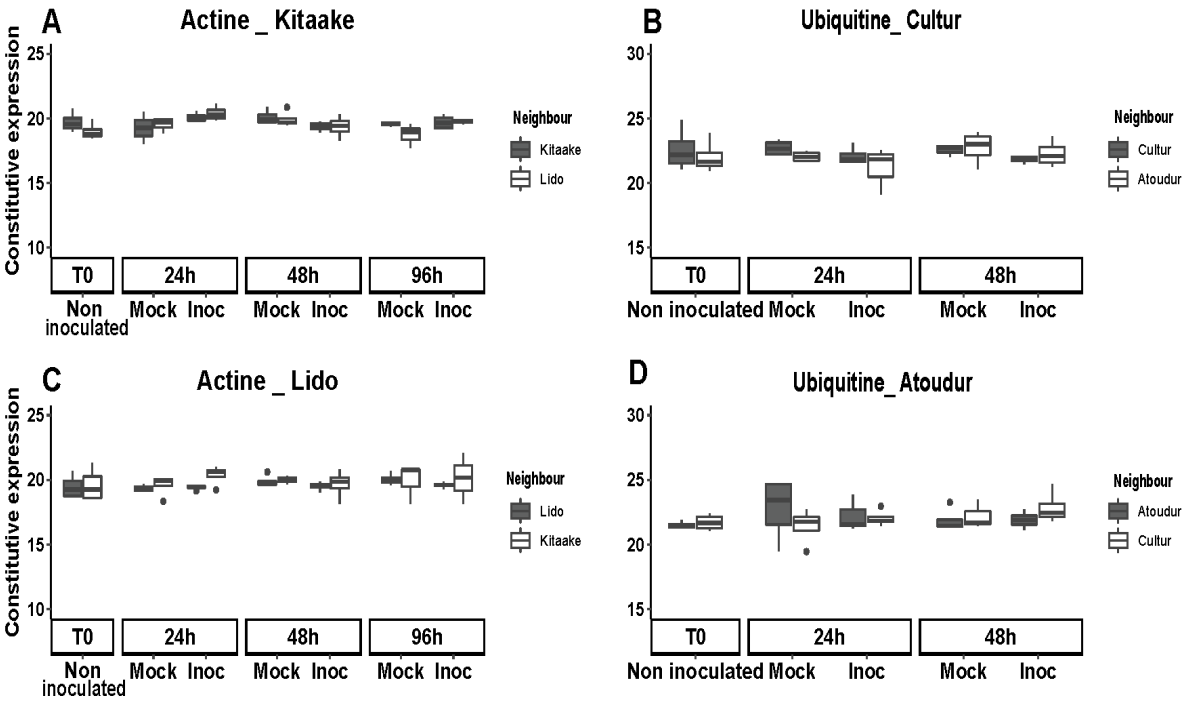


Fig. S2 Expression of housekeeping genes

Gene expression was meas ured leaves of plants grown in pure (grey bars) or mixture conditions (white bars) in the same conditions presented in the Fig.5 et Supplementary Fig.S5. For rice, KIT (A) or LID (C) were grown with itself or in the presence of conspecific LID and KIT respectively. For wheat, CUL (B) or ATO (D) were grown with itself or in the pre sence of the conspecific neighbo ur ATO or CUL.The expression of each of housekeeping genes , actin (Os03g50890) and ubiquitin (CD921597) for rice and wheat respectively, was measured by Quantitative RT- PCR. The original CT obtained from 1:10 cDNA prepared with 5ug of RNA are shown. The mean +/- SE of at least 4 replicates is shown. Statistical groups were calculated by Tukey HSD test and no significant differences were found between groups (neighbour, time or inoculation) for each genotype.

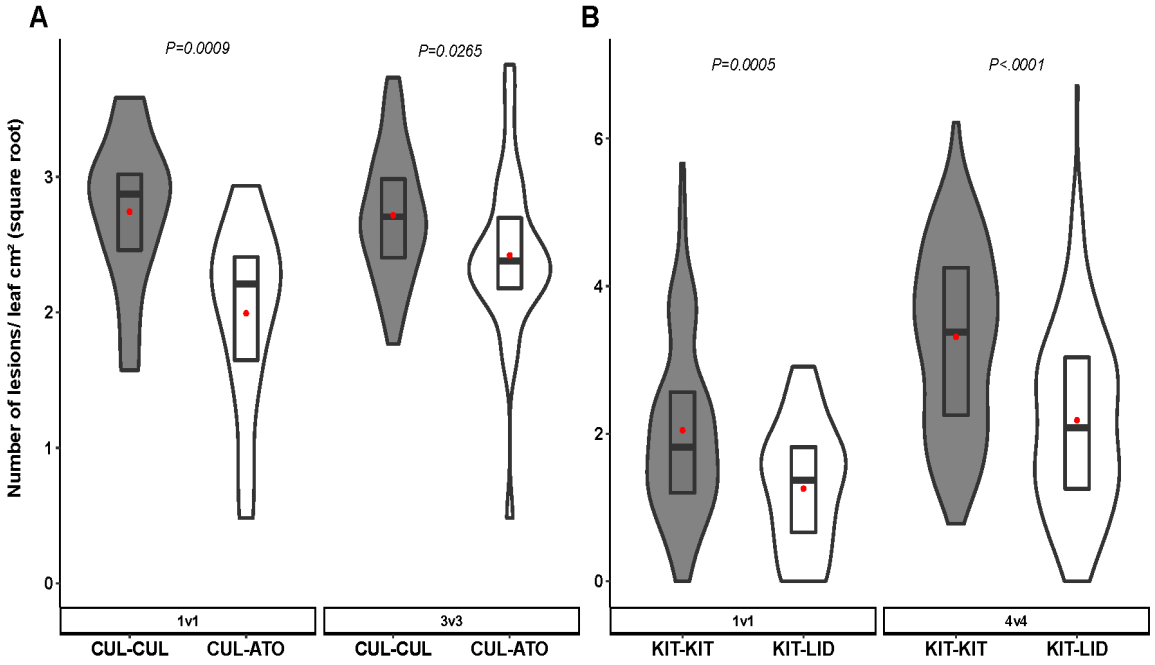


Fig. S3 Evaluation of intra-genotypic and inter-genotypic contributions to plant-plant interactions.

Mixture models or wheat (A) and rice (B) were put in conditions allowing inter-genotypic interactions (1v1: 1 focal plant and 1 neighbour) or intra- and inter genotypic interactions (3v3: 3 focal and 3 neighbour plants and 4v4: 4 focal and 4 neighbour plants). The volume of soil in 1v1 and 3v3 or 4v4 experiment was adjusted to maintain similar plant density. Mixtures and their controls were inoculated with the pathogen *P.triticina* for wheat and *M. oryaze* for rice. For wheat, the focal plant CULTUR was grown with itself (CUL-CUL) or in the presence of ATOUDUR conspecific neighbour (CUL-ATO). For rice, the focal plant KITAAKE was grown in the presence of itself (KIT-KIT) or in the presence of the conspecific neighbour LIDO (KIT-LID). Violin plots are representing the distribution of the data, the red dots represent the mean of the dataset. Each violin plots represented at least n=42 (4v4) or n=18 (1v1) plants for rice and n=36 (3v3) or n=18 (1v1) plants for wheat. At least 3 independent different experiments of 4 or 6 replicates each for wheat and rice respectively are shown. Statistical p values were determined according to ANOVA, followed by a Dunnett test on the linear model described in Methods.

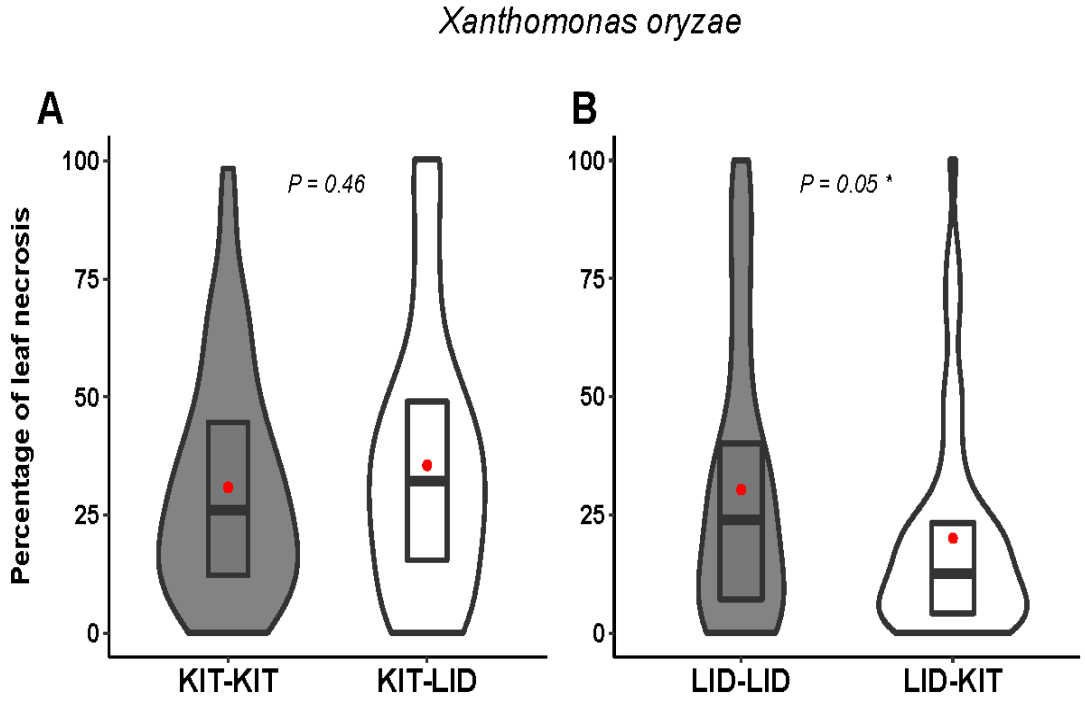


Fig. S4 Response of selected intra-specific mixtures of rice on disease susceptibility to *Xanthomonas oryzae*.

Rice plants in the mixture model between KITAAKE and LIDO were inoculated with the bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and lesion size was measured on each genotype in the presence of itself (KIT-KIT and LID-LID) or in the presence of its conspecific neighbour (KIT-LID and LID-KIT). Violin plots are representing the distribution of the data, the red dots represent the mean of the dataset. Each violin plots represented at least n=42 plants. At least 3 different experiments of 6 replicates each are shown. Statistical p values were determined according to ANOVA, on the linear model described in Methods.

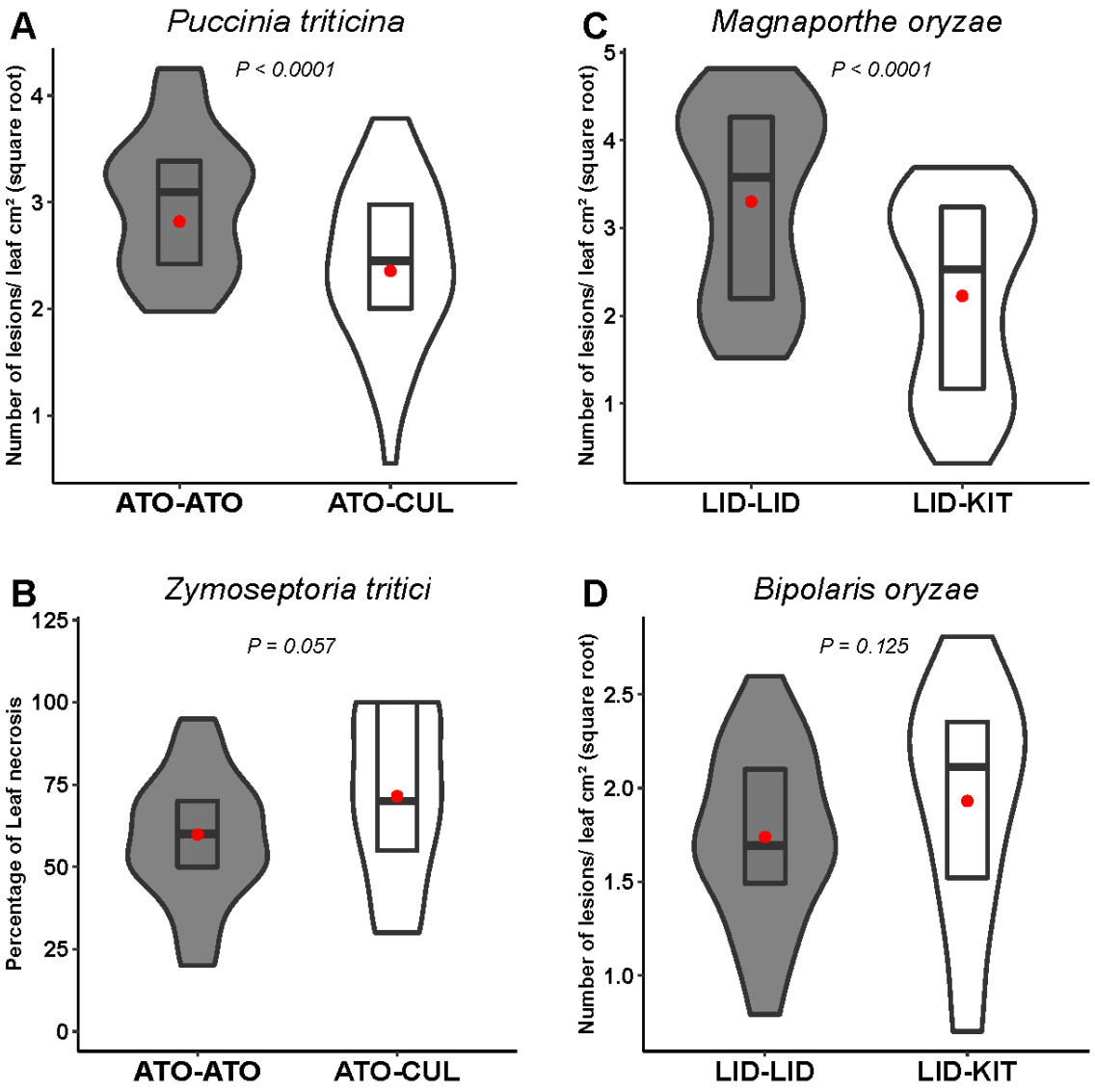


Fig. S5. Effects of different pathogen lifestyles on responses of disease susceptibility in selected intra-specific mixtures in rice and wheat.

Mixture models and their pure control were inoculated with the fungal pathogen indicated above each graph. For wheat (A and B), the focal plant ATOUDUR was grown with itself (ATO-ATO) or in the presence of the conspecific neighbour CULTUR (ATO-CUL). For rice (C and D), the focal plant Lido was grown in the presence of itself (LID-LID) or in the presence of the conspecific neighbour KITAAKE (LID-KIT). Violin plots are representing the distribution of the data, the red dots represent the mean of the dataset. Each violin plots represented at least n=42 plants for rice and n=36 plants for wheat. At least 3 different experiments of 4 or 6 replicates each for wheat and rice respectively are shown. Statistical p values were determined according to ANOVA, on the linear model presented in Methods.

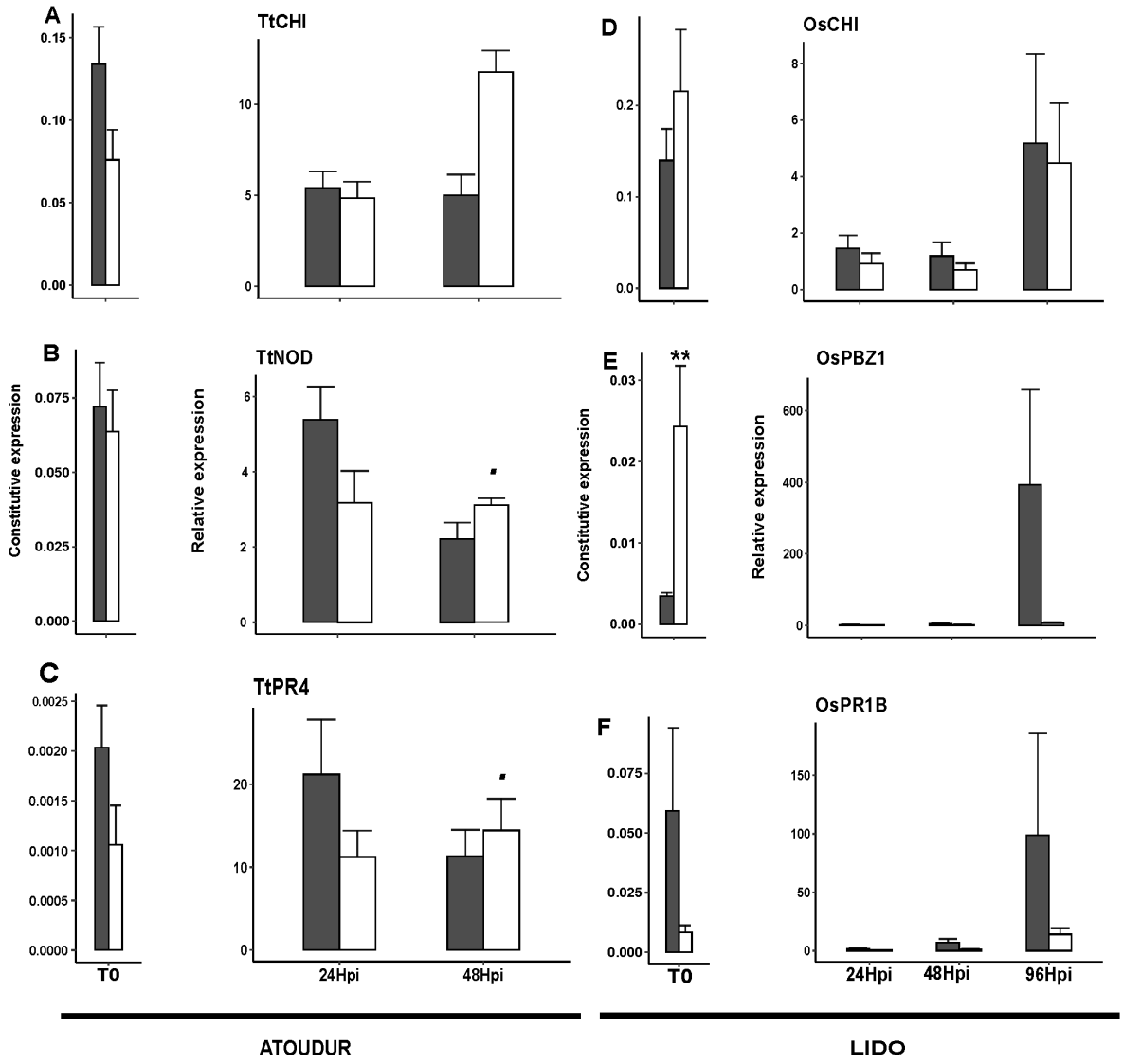


Fig. S6. Expression of immunity-related genes in the wheat ATO genotype and the rice LID genotype when they were the focal plants (reciprocal data for Fig. 5).

Gene expression was measured leaves of plants grown in Pure (grey bars) or mixtures (white bars). For wheat, Atoudur was grown with itself or in the presence of the conspecific neighbor Cultur (A, B and C). For rice, Lido was grown with itself or in the presence of conspecific Kitaake (D, E and F). For each graph, the name of the defense gene is indicated (*Tt* genes for wheat and *Os* genes for rice). Gene expression was measured by before infection (T0) and at different hours post inoculation (hpi) with *P. triticina* for wheat (24 and 48 hpi) and *M.oryzae* for rice (24, 48 and 96 hpi). The expression of each defense marker gene measured by Quantitative RT -PCR was normalized with actin and ubiquitin for rice and wheat respectively. For the expression data before inoculation (T0), the constitutive expression is shown while for time points after inoculation, a ratio of expression between inoculated and non-inoculated conditions is shown. The mean +/- SE of at least 6 replicates is shown. The statistical differences, as estimated by Wilcoxon tests, between conditions are shown for each time point (. : $p < 0,1$; * : $p < 0,05$;** : $p < 0,01$). The data corresponding to the reciprocal genotypes considered as focal is provided in Fig.5.

Table S1. Summary of the experiences and expected outcomes

Treatment	Outcomes awaited	Pathogen	Plant species	Focal tested	Neighbour
Screening experience (**Fig.1**)	Identification of pairs	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	9 different temperate japonica
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	9 different Durum wheat
Inter genotypic experience (1v1) (**Fig.S2**)	Comparaision of intra and inter genotypic interaction	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
Disease assesment (**Fig.2**, **Fig.S3,S4**)	Impact of mixture on disease susceptibility	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
				LIDO	KITAAKE
		Bipolaris oryzae		KITAAKE	LIDO
				LIDO	KITAAKE
		Xanthomonas oryzae		KITAAKE	LIDO
				LIDO	KITAAKE
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
				ATOUDUR	CULTUR
		Zymoseptoria tritici		CULTUR	ATOUDUR
				ATOUDUR	CULTUR
Soil sterilization (**Fig.3**)	Implication of the root microbiota	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
Porus soil separation (**Fig.3**)	Requirement of root contact	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
Plastic soil separation (**Fig.3**)	Implication of soil compartment	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
Neighbour unifected (**Fig.4**)	Requirement for infected or uninfected neighbour	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
Neighbour inoculated and covered after inoculation (**Fig.4**)	Requirement of aerial contact communication	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
Transcriptomic analysis (**Fig.5**, **Fig.S5**)	Expression of defense gene in mixture	Magnaporthe oryzae	Rice	KITAAKE	LIDO
				LIDO	KITAAKE
		Pucina triticina	wheat	CULTUR	ATOUDUR
				ATOUDUR	CULTUR

Table S2. List of the durum wheat genotypes used in this study

Name	Origin	Abreviation
ALEXIS	FRANCE	ALE
ATOUDUR	FRANCE	ATO
ARGELES	FRANCE	ARG
CULTUR	FRANCE	CUL
JANEIRO	FRANCE	JAN
LIBERDUR	FRANCE	LIB
GALADUR	FRANCE	GAL
NEODUR	FRANCE	NEO
OBELIX	FRANCE	OBE
SCULPTUR	FRANCE	SCU

Table S3. List of the temperate japonica rice genotypes used in this study

Name	Origin	Abreviation
BOMBILLA	Italy	BOM
CARINA	Italy	CAR
GRITNA	Italy	GRI
KING	Italy	KIN
LIDO	Italy	LID
LUXOR	Italy	LUX
MARATELLI	Italy	MAR
NIPPONBARE	Japan	NIP
KITAAKE	Japan	KIT
SALVO	Italy	SAL

Table S4. List of the wheat genes used in this study

Gene name	Gene ID	Primer sequence
Ubiquitin	CD921597	CTGGCGAGGATATGTTCCAT TCGGATGGAAGACCTTTGTC
TtNOD	Ta.27299.1.S1_x_at	GCCGGTTGCACGAGTAAA TTACGAAAAGCGGAAGAGGA
TtPR4	Ta.9226.1.S1_at	ATAAAAGGCTAGCTAAAAGTAAGTTGA TTTGAATAGATAACCCGTTTGG
TtCHI	Ta.2784.1.A1_at	TGCGCTACTGCAGCATACTC ACCATACGAATCAACTGATCACA

Table S5. List of the rice genes used in this study

Gene name	Gene ID	Primer sequence
Actine	Os03g50890	GCGTGGACAAAGTTTTCAACCG TCTGGTACCCTCATCAGGCATC
OsPBZ1	Os12g36880	CCTGCCGAATACGCCTAAGATG AGAACACATTCAGACTTGCCTCTC
OsPR1B	Os01g28450	CGAGAAGAGCGACTACGACTAC GCCTCTGTCCGACGAAGTTG
OsCHI	Os07g35560	TTAACGGCGCTGCTACCATT TCCCATCCTCTTACTGCCGA

Chapitre 2

Résultats complémentaires

Le voisinage intra-spécifique impacte t'il l'écophysiolgie de la plante focale ?

Analyse des réponses écophysiologiques et du contenu des feuilles en acides aminés chez la variété Kitaake en présence de voisins intra-spécifiques

I.Objectif et présentation de l'étude complémentaire.

L'article 2 ci-dessus identifie différentes caractéristiques de la modification de sensibilité aux agents pathogènes (NMS) dans les interactions plante – plante intra-spécifiques. Premièrement, il confirme que la sensibilité à différents pathogènes peut être modifiée chez le riz et chez le blé, et associe ce phénotype à une interaction inconnue se déroulant dans le sol. De plus, on peut voir que l'immunité joue un rôle, notamment chez le riz où la présence de voisins intra-spécifiques « sains » entraine non seulement l'augmentation du niveau d'expression constitutif de certains gènes de défenses, mais également une induction plus forte pendant l'infection. Cependant, plusieurs éléments, comme le fait que la sensibilité à l'agent pathogène *X.oryzae*, ne soit pas modifié par le voisinage intra-spécifique, indiquent aussi que l'immunité seule ne peut pas être à l'origine du phénomène de NMS. Cette hypothèse était déjà formulée dans notre chapitre 1 dans le cas de la population Acuce.

Afin de pouvoir valider ou invalider certaines de nos hypothèses décrites dans la discussion ci-dessus, nous avons exploré d'autres réponses des plantes focales qui pouvaient potentiellement être aussi modifiées par le voisnage intra-spécifique. Dans cette partie nous nous focalisons donc sur les réponses écophysiologiques de la plante focale tant au niveau biochimique que anatomique et tentons ainsi d'identifier certaines des réponses qui pourraient être reliées à la NMS comme :

1. Une modification du métabolisme primaire et de la concentration en certains métabolites. En phytopathologie, mesurer les variations du métabolisme des acides aminés est particulièrement pertinent car il sont directement liés au développement de la maladie et aux réactions de défense (Zeier, 2013). Des études fonctionnelles chez *A. thaliana* indiquent même que le métabolisme des acides aminés contribue davantage à la défense des plantes contre les maladies que certaines molécules de défenses comme les phytoalexines par exemple (Seifi *et al.*, 2014). De plus, sur le plan métabolique, les acides aminés sont les précurseurs de nombreuses molécules liées à la défense. Par exemple, le glucosinolate est une phytoalexine majeure chez les plantes de Brassica, et différentes catégories de glucosinolates sont dérivées d'acides aminés comme l'alanine, la phénylalanine et le tryptophane (Sønderby *et al.*, 2010). Les acides aminés peuvent aussi être liés à la production de phytohormone dans les réactions de défense, par exemple chez le riz, un lien a été montré entre la production d'acide salicylique et la quantité d'acides aminés. En effet, les réactions de défense lié au SA sont induites chez

le riz contre *M. oryzae* par des acides aminés tels que le glutamate (Kadotani *et al.*, 2016). Par ailleurs, les acides aminés sont aussi une des sources majeures de nutrition pour les champignons foliaires (Sun *et al.*, 2020). En effet, l'azote végétal est principalement stocké dans des acides aminés de transport de l'azote tels que l'aspartate, le glutamate, l'asparagine et la glutamine. Ces acides aminés produits par les plantes sont une source importante d'azote pour la croissance des champignons. Les pathogènes peuvent même manipuler le métabolisme des plantes pour leur permettre d'acquérir les nutriments dont elles ont besoin (Sun *et al.*, 2020).

2. Une modification du développement et de la biomasse des plantes. Compte-tenu des liens entre croissance et défense (Huot *et al.*, 2014), une réduction de la croissance de la plantule pourrait par exemple entrainer une augmentation des défenses (Donaldson *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2016).

Afin de tester ces hypothèses, deux nouvelles séries de mesures ont été réalisées sur la variété Kitaake en présence de voisins intra-spécifiques. Ainsi, une analyse du contenu métabolique sur les mêmes échantillons de feuille de riz qui ont servi à l'extraction d'ARN de l'article 2 a été réalisée (protocole disponible en **Annexe.1**). Ces analyses de contenus métaboliques ont été réalisées lors de mon séjour en Chine à l'université du Yunnan (Kunming). Dans un second temps une analyse des réponses écophysiologiques anatomiques de la plante a été réalisée par Cyril Drago au cours de son stage de Master 1.

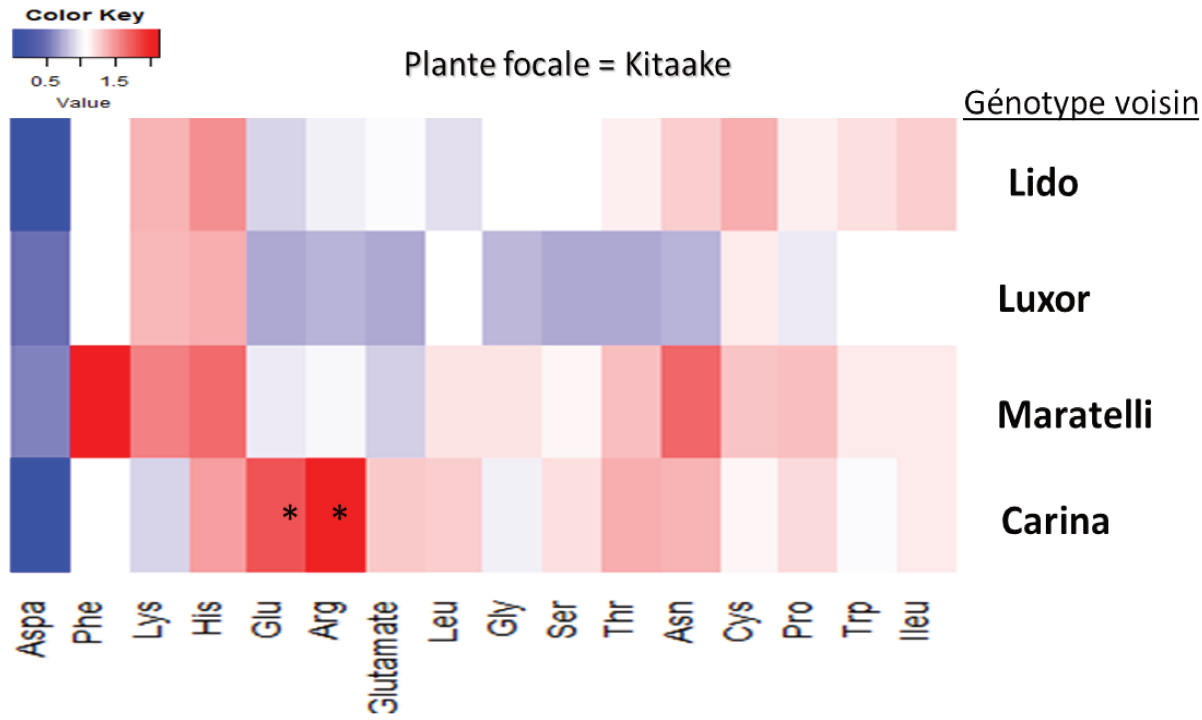


Figure 13. Heatmap des variations de concentrations en acides aminés chez la variété Kitaake en présence de différents voisins intra-spécifiques, avant inoculation.

La heatmap a été générée à partir de ratio mix/pure des concentrations en acides aminés chez les plantes de Kitaake en présence de différents voisins. Une couleur rouge indique une concentration supérieure à celle de la culture pure alors qu'une couleur bleue indique une réduction de la concentration. Les ratios ont été calculés en divisant la valeur moyenne ajustée (Lsmeans) de la concentration d'un acide aminé en mélange à sa moyenne ajustée en culture pure. La concentration a été estimée à partir de feuilles âgées de 3 semaines avant inoculation provenant de 2 expériences de 4 répétitions chacune. Une étoile indique une différence significative de la concentration brute en acides aminés entre le mélange et la culture pure. Cette différence a été analysée par ANOVA, Tukey HSD test (p value 0.05)

II.Résultats et discussion

Afin d'analyser les réponses écophysiologiques de la variété Kitaake soumis au voisinage intra-spécifique, nous avons sélectionné 3 variétés voisines : Lido et Luxor, identifiés comme des voisins avec un effet NMS positif sur la sensibilité de Kitaake dans l'article 2, et Maratelli qui s'est révélé un voisin variable dans son phénotype NMS, tantôt positif (Cf article chapitre 1), tantôt neutre (Cf article chapitre 2) selon les expériences. De plus, la variété Carina a été introduite car étant la seule ayant montré un effet NMS initialement négatif sur la sensibilité de Kitaake mais son phénotype étant trop variable, cette variété a été exclue des futures analyses.

II.1. Modifications biochimiques de Kitaake en présence de plantes voisines

La concentration en acide aminés a été évaluée sur les même échantillons qui ont servi aux mesures de l'expression des gènes des défenses présentées dans l'article 2. Une mesure a été effectué avant inoculation, après 3 semaine de culture (« T0 ») et 3 mesures ont été réalisées 24h, 48h et 96h après inoculation. Pour chaque mesure après inoculation, les résultats ont été normalisés par les concentrations présentes dans les échantillons contrôle (Inoculés avec une solution sans spores de *M. oryzae*) comme décrit dans l'article 2 pour l'analyse des gènes de défenses.

Avant inoculation, il est intéressant de constater que le niveau d'aspartate semble moins élevé chez Kitaake lorsqu'il est exposé au voisinage intra-spécifique, qu'importe le voisin présent et cela avant inoculation (**Figure.13**). L'aspartate étant un des acides aminés majeurs pouvant jouer un rôle dans les réactions de défense (Brauc *et al.*, 2011), de futures analyses sur sa modulation par le voisinage végétal pourrait en partie permettre d'élucider son rôle dans les réponses associés à la NMS.

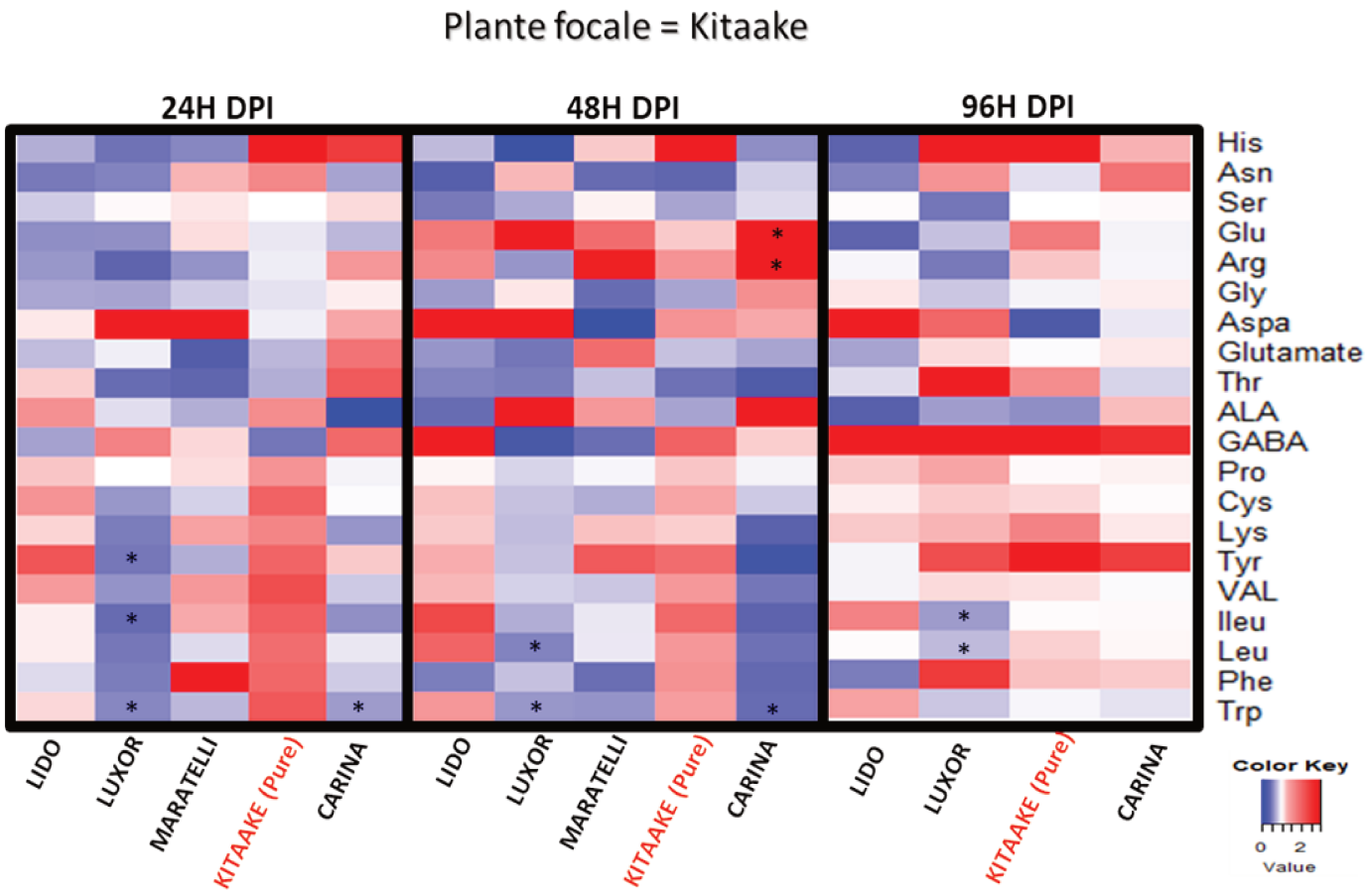


Figure 14. Heatmap des variations de concentration en acides aminés chez la variété Kitaake en présence de différents voisins intra-spécifiques, après inoculation.

La heatmap a été générée à partir des ratios Feuilles inoculées/Feuilles non inoculées des concentrations en acides aminés chez les plantes de Kitaake en présence de différents voisins. Une couleur rouge indique une concentration 2 fois supérieure à celle du témoin non inoculé alors qu'une couleur bleue indique une réduction de moitié de la concentration. Les ratios ont été calculés en divisant la valeur moyenne ajustée (Lsmeans) de la concentration d'un acide aminé chez Kitaake en présence d'un voisin spécifique 24, 48 ou 96h après inoculation par la Lsmeans de kitaake en présence du même voisin inoculé avec la solution contrôle en présence d'un voisin. La concentration a été estimée à partir de feuilles âgées de 3 semaines provenant de 2 expériences de 4 répétitions chacune. Une étoile indique une différence significative de la concentration brute en acides aminés entre le mélange et la culture pure. Cette différence a été analysée par ANOVA, Tukey HSD test (p value 0.05)

L'analyse de nos résultats révèle que le niveau d'acide aminés est globalement peu modifié chez la variété Kitaake en fonction de son voisinage avant inoculation. Cependant les niveaux de glutamine et d'arginine sont plus élevés lorsque Kitaake est en présence de la variété Carina (**Figure.13**). Ce résultat est intéressant car l'inoculation avec *M. oryzae* entraine aussi une augmentation de ces deux acides aminés, et on peut voir que l'augmentation est plus importante lorsque Kitaake est en présence de la variété Carina, notamment 48h après inoculation (**Figure.14**). Ces résultats pourraient expliquer le phénotype NMS négatif de la variété Carina, en effet, le taux de glutamine a été montré comme un des facteurs importants pouvant expliquer la virulence de *M. oryzae* (Huang *et al.*, 2017).

En conclusion, l'étude du contenu en acides aminés chez la plante Kitaake montre que la concentration en acide aminés peut être significativement modulée dans certains cas par la présence d'un voisin intra-spécifique. Cependant, les variations des concentrations en acides aminés dues au voisinage intra-spécifique restent limitées et ne peuvent pas, à elles seules, expliquer les variations de sensibilité observées dans nos résultats ; mais elle fournissent des éléments de réflexion utiles sur l'impact du voisinage et notamment sur la nutrition des plantes en mélange.

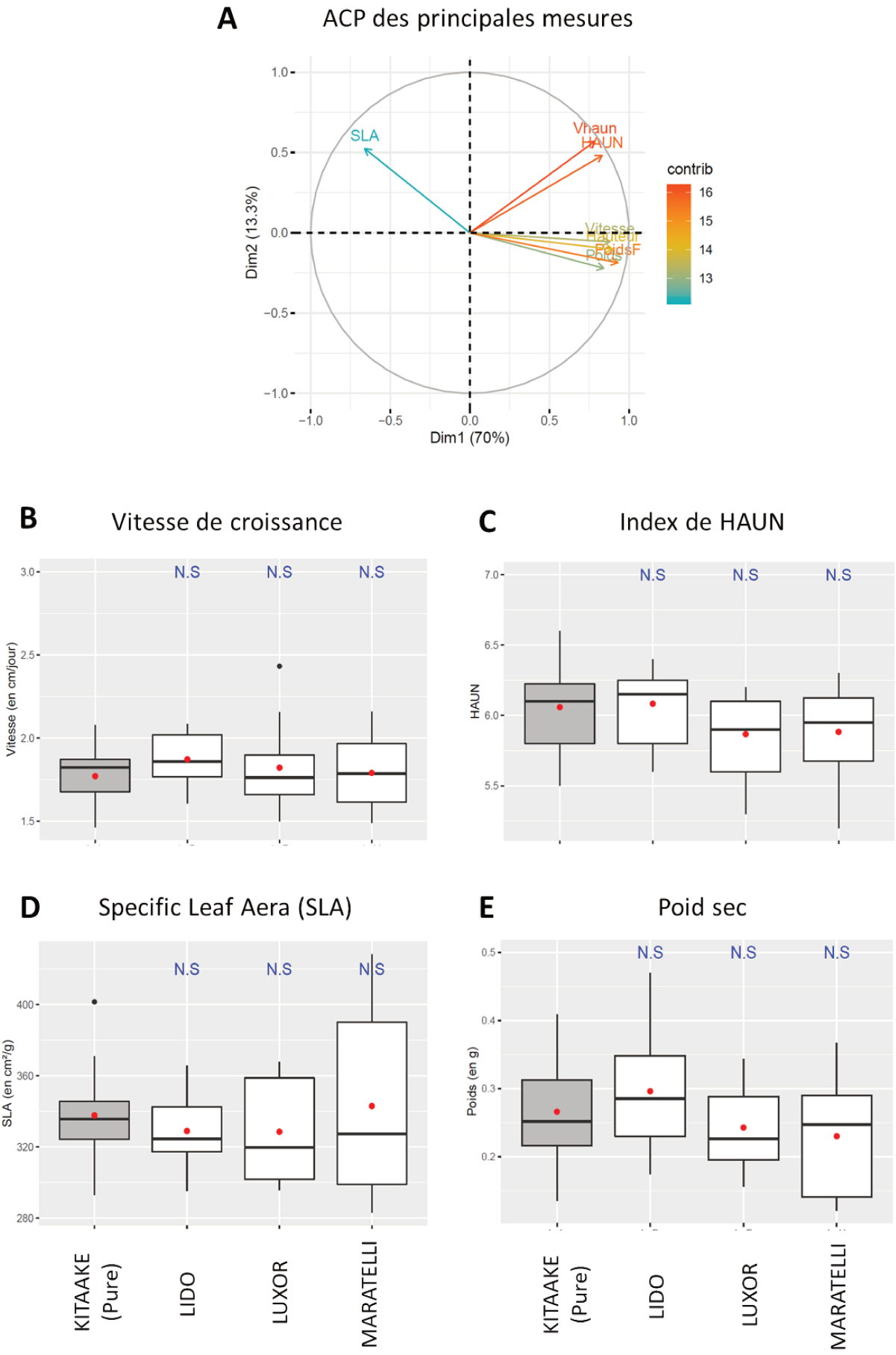

A
ACP des principales mesures
SLA
Vhaun
HAUN
Vitesse
Hauteur
PoidsF
Poids
contrib
16
15
14
13
Dim2 (13.3%)
Dim1 (70%)
1.0
0.5
0.0
−0.5
−1.0
B
Vitesse de croissance
Vitesse (en cm/jour)
C
Index de HAUN
HAUN
D
Specific Leaf Aera (SLA)
SLA (en cm²/g)
E
Poid sec
Poids (en g)
N.S
KITAAKE (Pure)
LIDO
LUXOR
MARATELLI

Figure 15. Mesures développementales et anatomiques chez la variété Kitaake en présence de voisins intra-spécifiques

A) Analyse en compoosante principales des différentes variables mesurées chez la variété Kitaake en présence de voisins intra-spécifique.

B) Vitesse de croissance moyenne (en cm par jour) d'une plante en présence de voisins spécifiques. Les vitesses ont été calculées à partir de la hauteur étendue mesurée tous les deux jours.

C) Estimation de l'index d'Haun moyen après 5 semaines de croissance calculée à l'identique de Haun, 1973

D) Specific leaf area (SLA) de la dernière feuille ligulée après 5 semaines de croissance. Avant la mesure du poids et de la surface des feuilles, les feuilles ont été coupées et réhydrater pendant une nuit dans de l'eau déminéralisée à l'obscurité. **E)** Poids sec moyens des parties aériennes d'une plante après 5 semaines de croissances. L'ensemble des mesures a été réalisées sur le génotype Kitaake, dans 2 expériences de chacune 6 répétitions, les comparaisons statistiques ont été testées par test de Dunnett en utilisant le mélange pure comme référence

II.2. Le voisinage n'a pas d'impact sur le développement et l'anatomie aérienne de la plantule

Afin d'analyser les réponses au niveau développemental et anatomique, plusieurs mesures ont été réalisées. Avant tallage plusieurs mesures permettent de caractériser la croissance de la plantule, notamment sa hauteur et son développement foliaire (Walker *et al.*, 2014; Freschet *et al.*, 2015). Tout d'abord des mesures de hauteur étendue (entre le collet et le point le plus haut de la plante étendue) et d'indice de Haun ont été réalisées en cinétique, tous les deux jours, puis des mesures destructives (SLA, biomasse poids sec et frais aérien) ont été réalisées à la fin de l'expérience. L'indice d'Haun est traditionnellement utilisé pour connaitre l'état de développement des feuilles nouvellement formées chez les monocotylédones (Haun, 1973). Il est calculé en estimant le pourcentage de développement de la feuille en croissance en se basant sur la feuille de l'étage foliaire inférieur. Deux expériences ont été menées, une qui a duré 3 semaines, correspondant à notre temps T0 où nous inoculons les plantes ou collectons des échantillons et une qui a duré 5 semaines de croissance afin de tester si des différences de croissance invisibles à 3 semaines de croissance pouvaient l'être un peu plus tard. Ici, nous présentons les résultats obtenus après 5 semaines de croissance mais des résultats identiques ont été observés après 3 semaines de croissance.

L'analyse par composante principale (ACP) de l'ensemble des données collectées sur Kitaake, quel que soit le voisinage, révèle que la vitesse de croissance, la hauteur moyenne des plantes, leur poids frais et sec sont extrêmement corrélés après 5 semaines de croissance. Ceci révèle que la vitesse de croissance peut donc être estimée grâce à la mesure du poids ou de la hauteur moyenne à 5 semaines. De façon similaire, l'indice de Haun moyen mesuré après 5 semaines de croissance, avant les mesures destructives, est extrêmement corrélé à la vitesse de Haun moyenne « Vhaun » (la valeur d'index d'Haun moyenne gagnée par jour par la plante) mesurée en cinétique. Contrairement au reste des variables, la SLA est représentée sur l'autre axe de l'ACP, un résultat logique puisque la SLA a été calculée sur la surface de la dernière feuille ligulée divisée par son poids frais (lui-même corrélé avec le poids total des parties aériennes) ; il est donc normal qu'elle soit anti-correlée avec le poids sec ou frais de la plante entière.

La stabilité l'indice d'Haun après 5 semaines de croissances indique donc un nombre de feuilles et un développement identique chez les variétés de Kitaake cultivées en présence de différents voisins. Par ailleurs les mesures de SLA (Specific Leaf Area), utilisé comme indicateur de la croissance d'une plante mais aussi de son utilisation des ressources du sol (Walker *et al.*, 2014; Freschet *et al.*, 2015) ne présentaient aucune différence significative. Similairement, le poids sec des plantes de Kitaake, utilisé pour analyser les réponses anatomiques précoces d'autre monocotylédones comme le blé (Henry *et al.*, 2020), n'était pas modifié.

L'ensemble de ces mesures renseigne sur l'intensité de la compétition et sur les modifications de croissance (Violle *et al.*, 2009). Leur stabilité chez Kitaake soumis à différents voisins indique qu'aucun phénomène de facilitation ou de compétition n'a pu être détecté dans notre dispositif expérimental. Cependant, dans notre système expérimental, nous n'avons pas pu mesurer l'ensemble des réponses développementales et anatomiques de la plante (par exemple le compartiment racinaire). De plus, nous n'avons testé que peu de voisins intra-spécifiques à un stade très jeune (3 voisins, 5 semaines de croissance), stade ou peu de différences anatomiques sont détectables entre les différents génotypes. Ces éléments ne nous permettent donc pas d'exclure que le voisinage végétal intra-spécifique puisse influencer d'autre composantes de la croissance d'une plante focale de riz.

Chapitre 3

Plant neighbours trigger genetically controlled changes of susceptibility and well-defined transcriptional changes in their plant neighbourhood

Pélissier Rémi, Ducasse Aurélie, Ballini Elsa, Frouin Julien, Violle Cyrille, Jean-Benoit Morel

Article de recherche en préparation pour le journal New Phytologist

I.Présentation générale

Le chapitre précédent nous a permis de mieux cerner les éléments déclencheurs et les réponses associées à la NMS. Nos expériences ont révélé que la NMS pouvait être déclenchée par des voisins sains et qu'elle nécessitait une interaction entre les génotypes dans le sol. Dans la plante focale, la NMS est associée à une réponse immunitaire chez le riz mais pas chez le blé, cependant chez les deux espèces la NMS peut modifier la sensibilité à différents pathogènes de manière opposée. Chez le riz quelques modifications de concentrations de certains acides aminés ont été détectées, en revanche le voisinage intra-spécifique ne semble pas modifier les caractéristiques d'écophysiologie aérienne mesurées des plantes focales.

Dans ce chapitre, nous avons voulu explorer plus en détails le déclenchement et les réponses associés à la NMS. Nous avons utilisé trois approches différentes :

Premièrement, la gamme de réponse des plantes focales a été explorée en utilisant un jeu de voisins constitué de 280 génotypes de riz japonica tempéré. Ces génotypes sont cultivés au voisinage du génotype Kitaake un par un en conservant notre dispositif expérimental de mélange binaire en conditions contrôlées. Nous avons mesuré l'impact de chacun de ces 280 génotypes sur la sensibilité du génotype Kitaake à *M. oryzae* mais aussi sur sa biomasse aérienne moyenne après 3 semaines de croissance.

Ensuite, pour mieux caractériser les déterminants génétiques associés à l'émission de la NMS, ces mesures phénotypiques (sensibilité à *M. oryzae* et biomasse) ont été mis en relation avec les polymorphismes nucléotiditiques (SNPs) des génomes voisins dans une analyse d'association pangénomique (GWAS).

Enfin dans le but d'améliorer nos connaissances sur l'impact du voisinage intra-spécifique sur les réponses transcriptomiques des plantes focales, nous avons sélectionné quelques voisins qui ont des effets contrastés sur la sensibilité de Kitaake à *M. oryzae*. Nous avons ainsi caractérisé la réponses transcriptomique de Kitaake cultivé en présence de ces voisins en utilisant une collection de plus de 90 gènes, sélectionnés dans la bibliographie et permettant de mesurer différents processus majeurs dans les feuilles de riz.

II. Article de recherche: Plant neighbours trigger genetically-controlled changes of susceptibility and well-defined transcriptional changes in their plant neighbourhood

Pélissier Rémi[1], Ducasse Aurélie[3], Ballini Elsa[2], Julien Frouin[4], Violle Cyrille[5], Jean-Benoit Morel[3]¥

Author affiliations

1: PHIM, CEFE, Institut Agro, INRAE, CIRAD, Univ Montpellier, Montpellier, France.

2: PHIM, Univ Montpellier, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Montpellier, France.

3: PHIM, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Univ Montpellier, Montpellier, France.

4: AGAP, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

5: CEFE, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

Abstract

- Conspecific neighbours have been neglected as a part of the close environment that can alter plant biological processes and with a few exceptions, the molecular responses to neighbours is unknown in plants. Recently, changes of plant susceptibility to pathogen resulting from direct plant-plant intra-specific interactions were demonstrated in rice and wheat, a phenomenon called NMS (Neighbour-Modulated Susceptibility; Pélissier et al., 2021b). However, the genetics of NMS and the molecular responses associated are largely unexplored.
- Here we analysed under controlled conditions, in binary mixtures, the modification of biomass and susceptibility to the blast pathogen of the Kitaake focal genotype in the presence of 280 different neighbour genotypes. We used a GWAS analysis to identify the loci in the neighbour that determines the response in focal Kitaake. Using a transcriptomic approach, we characterized the molecular responses of focal Kitaake plants co-cultivated with a range of neighbours showing contrasted modulation of susceptibility in Kitaake plants.
- Our study demonstrates that NMS in rice focal plants is controlled by one major locus in the neighbour genome. Furthermore, we show that the modulation of susceptibility is associated with important, characteristic patterns of gene expression in Kitaake. Our study sheds lights on how neighbours affect the physiology of focal rice and opens new perspectives for optimizing cultivar mixtures using genetically defined neighbours.

Introduction

In their environment, plants are constantly exposed to biotic (i.e pests, plants and pathogens) and abiotic (i.e water deficit, temperature changes) stresses that affect their physiology at various scales and intensity (Shameer *et al.*, 2019). Microorganisms are beyond the most studied biotic agents that can affect plant physiology, metabolism or immunity (Pandey *et al.*, 2017; Vannier *et al.*, 2019). Surprisingly, excepted when they are parasitic, neighbour plants are rarely considered as important biotic factors of the close environment of plants (Pandey *et al.*, 2017; Scheres & van der Putten, 2017; Saijo & Loo, 2020).

Plants have the ability to recognize different kinds of neighbouring plants (conspecific or heterospecific) and to induce responses upon this recognition (Dudley, 2015; Subrahmaniam *et al.*, 2018). These responses include changes in root biomass, bio-volume and more generally affect growth and physiology (Pierik *et al.*, 2013). Intra-specific interactions in barley have been shown to modify biomass shoot and root allocation (Ninkovic, 2003) and recently, intra-specific interactions in either rice or wheat were shown to modify susceptibility to diseases (Pélissier *et al.*, 2021b). This phenomenon, called NMS (Neighbour-Modulated Susceptibility) has been observed for a limited number of associations of conspecific genotypes of rice and wheat. However for a given focal plant, the possible range of modulation of susceptibility and biomass during NMS is unknown.

In plants, very few GWAS approaches have been undertaken to explore the response of a given focal plant to a various range of neighbour plants (Subrahmaniam *et al.*, 2018). For instance, the analysis of the developmental response of one focal *A. thaliana* ecotype to diverse neighbours allowed the identification of genetic loci in the neighbours that affected size and fitness related traits (Mutic & Wolf, 2007). In the case of NMS, although it was shown to result from an above-ground signal (Pélissier *et al.*, 2021b), there is no understanding of the mechanisms triggering such a change in focal plants by neighbours. More generally, there is yet no report of any indirect genetic effect by plant neighbours on disease susceptibility in focal plants.

The plant's response to environmental stresses has been extensively studied, in particular their transcriptional response (Tsuda & Somssich, 2015; Cohen & Leach, 2019; Bashir *et al.*, 2019). However, in case of the transcriptional response triggered by the presence of neighbour plants, only very few studies exist (Subrahmaniam *et al.*, 2018). At the intra-specific interaction level, studies are very limited and mostly focused on intra-specific competition experiments where

plant density was also modified (Masclaux *et al.*, 2012; Bowsher *et al.*, 2017). Only two studies reported on the transcriptional response to intra-specific interactions without changing plant density. In both, an induction of defence genes was observed, first in *A. thaliana* after exposure to root exudates from conspecific plants (Biedrzycki *et al.*, 2011) and second in rice and wheat cultivated with healthy conspecific neighbours (Pélissier *et al.*, 2021a). However these studies were limited to a small number (3) of genes, all monitoring immunity but none from other metabolic pathways. Thus there is only very limited knowledge on how a given focal plant responds to different conspecific neighbour plants.

Here, using our previously described NMS system in rice, we endeavoured to identify the range of phenotypical responses in a focal plant neighboured by various conspecific plants, the genetic loci in neighbour plants that control these responses and the transcriptomic responses associated with contrasted modifications of susceptibility in this focal plant. We analysed disease susceptibility, aerial biomass and, to some extent, the transcriptional responses of the rice Kitaake genotype in presence of 280 different intra-specific neighbours. These analyses provide new insights on the genetic control of plant-plant interactions that modulate susceptibility to pathogens and their associated transcriptional changes.

Materials and methods

Plant material and experimental setup

We used the rice genotype Kitaake (KIT) of *Oryza sativa* sp temperate japonica and a set of 280 other temperate japonica rice varieties (**Table S1**) originating from the European Rice Germplasm Collection as neighbours (Courtois *et al.*, 2012). To test the impact of intra-specific neighbour, Kitaake was grown in presence of Kitaake (Pure stand) or with plants of one of the 280 other genotypes (Mix condition).

The experiment was conducted in greenhouse using previously described experimental procedures (Pélissier *et al.*, 2021a). Briefly, eight plants (one row of 4 focal and one row of 4 neighbors) were grown in plastic pots (9x9x9,5 cm) filled with substrate (58% blond peat, 18% coconnut powder, 10% perlite, 9% volcanic sand, 5% clay) supplemented with 3,5g/L of fertilization (Basacote Native 6M, NPK 14-3-19) under 16h artificial light (55000 lumen) at 27°-23°C. The overall density of the experiments (~ 1 plant/ 10 cm2) was two-fold lower than usually practiced protocols (Berruyer et al., 2003) and the quantities of nutrients provided could limit competition for resources.

Pathogen material, inoculation and disease assessment

We selected the multivirulent CL26 strain (Gallet et al., 2015) *of the hemibiotrophic fungal pathogen Magnaporthe oryzae. CL26* strain was grown for 10 days on rice flour agar medium (20 g of rice flour, 15 g of agar, 2.5 g of yeast extract and 1 L of distilled water) under fluorescent light (12 h a day) at 26°C. *We harvested conidia by flooding the plate with 5 ml of sterile distilled water.* Thirty mL from a suspension of 100,000 conidia per mL (with 0.1% gelatin) were sprayed on each tray containing 15 pots *(~ 25000 conidia/plant) on three-week old plants as described in* Berruyer *et al.* (2003). Three pots were inoculated for each combination of Kitaake/neighbour genotypes.

After inoculation, rice plants were incubated for 16 h in a controlled climatic chamber at 25°C with 95% relative humidity and later returned to normal growth conditions. Six days after inoculation and before epidemics could start, we scanned at the same resolution (600 pixels per inch) the symptoms of the last, well-developed leaf of 3-4 focal plants per pot. Abnormal plants were not scored and pots with less than 3 focal and 3 neighbour were not counted. The pictures were analyzed by LeAFtool (Lesion Area Finding tool), an R package developed in-house and available on github depository (https://github.com/sravel/LeAFtool). The program measures lesion number and leaf area.

Parameters used for picture analysis were at least 10 000 pixels for leaves and 50 pixels for lesion areas, with a blur at 1. To account for outliers and software mistakes, we removed lesions with aberrant size from the analysis. Finally, leaf susceptibility was estimated by the number of a lesion per cm² of leaf area.

Biomass assessment

After 3 weeks of growing, we cut the aerial part of the 4 plants of Kitaake at the root crown level in 3 pots out of 6 per genotypic combination. The plants were dried in an oven at 37°C until complete drying (at least for 3 days). The weight of 4 dried plants was measured with a precision balance. Only the pots where 4 Kitaake plants and 4 neighbouring plants had grown correctly (4-leaves stage) were counted to reduce experimental bias. For the same reason, only mixtures where at least two replicates were available were further considered.

Data analysis

The following mixed linear model has been applied on all data to calculate *blup* for each phenotypes with the *lme4* R package (Bates *et al.*, 2015).

$$Y=\mu+\gamma k+\alpha i+\varepsilon ijk$$

With Y as the phenotype (biomass or disease susceptibility), μ as the theoretical mean, γ_k the trial fixed effect, α_i the random genotype effect and ε_{ijk} as residuals. For phenotypic analysis of disease susceptibility, biomass and haplotype group differentiation, we used a linear model where the number of lesions by cm² of leaves or biomass in Kitaake is a function of the trial effect and the genotypic identity of the neighbouring plant. This model was used to calculate Least Square means (LSmeans) using the *lsmeans* R package. Square root (for disease susceptibility) and log (for biomass) transformation was used to correct for normality and homocedasticity. The impact of neighbourhood on a focal plant was tested by ANOVA followed by a Dunnett test (Function *glht* from the package *multcomp*). Pure stand (Kitaake grown in presence of Kitaake) was used as control group for Dunnett correction.

Broad-sense heritability was calculated separately for each phenotype using sum square output of the analysis of variance (ANOVA), with $h^2 = \sigma^2G/(\sigma^2G+\sigma^2e/n)$, where σ^2G and σ^2e are the estimates of genetic and trial/residual sum square output.

Genotyping, linkage disequilibrium and Genome-Wide Association analysis

Genotype data used in this study were obtained from CIRAD (Frouin *et al.*, 2018). In our panel, we filtered markers with a call rate below 75%, an heterozygosity rate above 20% or a minor allele frequency (MAF) < 2.5. This matrix was imputed with Beagle 4.0 (window=250 overlap=25 ne=200). The final G matrix includes 19,997 SNPs with 331 genotypes and was used to calculate Linkage Desiquilibrium (LD), a Kinship matrix, and PCA using TASSEL software 5.2.59 (Bradbury *et al.*, 2007). Linkage Disequilibrium was estimated from the Kinship matrix as the square of the correlation of allelic states (r^2) between all pairs of markers on each chromosome. The Kinship matrix K was estimated by the Centered IBS method as described in (Endelman & Jannink, 2012). The population structure data were estimated with a Principal Component Analysis (PCA) with 4 axes kept. Two distinct GWAS were conducted with two mixed linear model (MLM) (One for leaf susceptibility, one for plant biomass) on a subset of 279 genotypes for leaf susceptibility and 254 for biomass analysis from the 280 that were used as neighbours.

For each models, the following mixed linear model has been applied on all data to calculate *blup* for each phenotypes with the *lme4* R package (Bates *et al.*, 2015); blup were used as phenotypic data.

$$Y=\mu+\gamma k+\alpha i+\varepsilon ijk$$

With Y as the phenotype (biomass or disease susceptibility), μ as the theoretical mean, γ_k the trial fixed effect , α_i the random genotype effect and ε_{ijk} as residuals.

Each GWAS were done with the same G, K, and PCA data, for the two phenotypic datasets. The threshold to declare a significant association was set to –log10 P = 5. A quantitative locus was identified if five SNPs were detected with a –log10 P close to 5 in same LD block. Gene annotations for selected loci were made using the Nipponbare temperate japonica rice reference genome viewed with the Orygenesdb genome browser (Vergne *et al.*, 2008). For the most significant QTL, haplotype groups were identified using SNP-seek (Mansueto *et al.*, 2017) and then correlated to our genotypic dataset. We ran a new linear fixed model including the haplotype effect to test the contrast test with a Tukey adjustment to estimate a haplotype group effect. The SNP-seek database was used to identify temperate japonica rice genotypes in the 3K genome database carrying 3 corresponding haplotypes at *NMS1* locus in order to generate a validation set of 42 genotypes of temperate japonica rice (13 genotypes for NMS1-1, 15 genotypes for NMS1-2 and 14 genotypes for NMS1-3) (**Table S2**). The genotypes from this

validation panel were used as neighbours for Kitaake in a new experiment and inoculated under the same conditions as those used for GWAS (see disease assessment).

RNA extraction and transcriptomic assay

For transcriptomic analysis, 12 neighbours were selected on the basis of their NMS effect on Kitaake and neighbours having the NMS1-3 haplotype were excluded on purpose. They were cultivated in presence of Kitaake as described before. Six repetitions were done for each Kitaake/neighbour combination. After 3 weeks of growth, for each pot, the last well developed leaf of the four plants of Kitaake were pooled for RNA extraction and each Kitaake/neighbour combination.

For RNA extraction, we used protocols described in Delteil *et al.* (2012). Frozen leaf tissues were ground in liquid nitrogen. Approximately 500 mg of powder was treated with 1 mL of TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA samples (5µg) were denatured for 5 min at 65°C with oligo(dT) 18 (3.5 mM) and deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (1.5 mM). They were later subjected to reverse transcription for 45 min at 37°C with 200 U of reverse transcriptase M-MLV (Promega, Madison, WI, USA) in the appropriate buffer. Two uL of cDNA samples were pre-amplified following the "Pre-amplification of cDNA for Gene Expression with delta Gene Assays" protocol provided by the manufacturer (BIOMARK, Fluidigm). The reactions were cleaned up using Exonuclease I (Exo I, 4U/uL). Gene expression analysis was perfomed with the 96.96 IFC Machine using the Delta Gene Assays and he protocol provided by Fluidigm on pre-amplified samples (5 µL gene assay mix and sample assays used for running the plate). Gene expression was measured for 96 genes identified in the literature. We selected genes that were known to be transcriptionally regulated in the different targeted processes (**Table S3**). Gene expression were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) using the 3 references genes EF1a, EF4a and UBQ5 with the R package "*fluidigr*". Genes for which expression was not detected in the entire data sample have been deleted from the analysis. For analysis and representation, each the expression of the samples has been normalized for each gene. For clustering analysis, a Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLSDA) was performed using the R package "*Mixomics"*. PLSDA is a linear classification that allows discrimination according to the pre-established groups in which each individual is declared, thus allowing a better identification of the declared groups than with classical PCA (Lê Cao *et al.*, 2011). Clustering of gene expression and heatmap visualization were done with the R package "*gplots.heatmap"*.

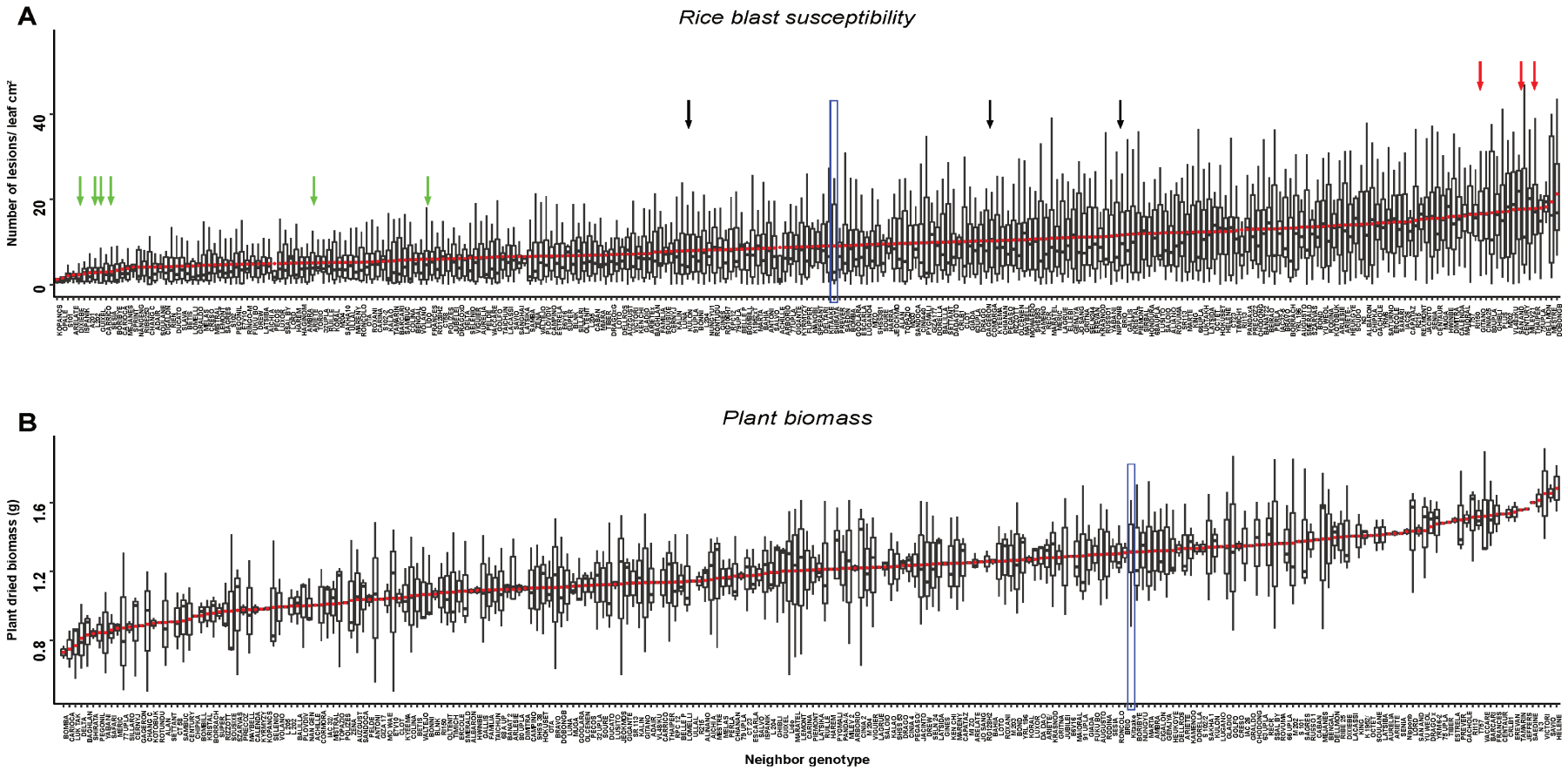


Figure.1 : Disease susceptibility and aerial biomass of Kitaake in the presence of conspecific neighbours.

Disease susceptibility to *M. oryzae* (CL26 strain) is represented by the number of lesions in the last developed leaf of Kitaake (A). Aerial biomass is represented by the dried weight of one Kitaake plant (B). For each indicated rice neighbour, at least 3 repetitions were done for disease and biomass measurements. Boxplots are representing the distribution of the dataset, the red dots represent the mean of the dataset. Means of neighbour effect on Kitaake are listed in ascending order for each phenotypes. Red rectangle represent the boxplot of the pure stand calculated by at least 20 repetitions. Arrows in (A) represent positive (green), neutral (black) and negative (red) neighbours that were used in Figure 3.

Results

Disease susceptibility, but not biomass, is strongly affected by the neighbourhood

Disease susceptibility to *M. oryzae* (**Fig 1. A**) and aerial plant biomass (**Fig 1. B**) were analyzed in Kitaake in presence of each of the 280 tested neighbours. The impact of a neighbour was estimated by comparing Kitaake in pure stand (cultivated with itself, red rectangle) to Kitaake in mixture (i.e. cultivated with another neighbour).

Kitaake susceptibility to *M. oryzae* was significantly affected by neighbours ($p < 2e\text{-}16$, ANOVA). The mean susceptiblity in pure stand was 9.1 lesions/cm² (S.D.=6.23). Out of the 279 genotypes retained for disease susceptibility analysis, the variation range was from -86% (1.2 lesions /cm²) to +134% (21.3 lesions /cm²), with 5 neighbours increasing susceptibility by more than 2-fold while 35 reducing it by more than 2-fold.

Kitaake biomass was also significantly affected by the presence of neighbours ($p = 0.0025$). The mean biomass of single plant in the pure stand of Kitaake was 1.31 g (S.D.= 0.18). Out of the 251 genotypes retained for biomass analysis, the variation range was from -41% (0.77 g/plant) to +28% (1.68 g/plant).

To see if the modification of disease susceptibility and biomass were linked to each other, we looked for correlation between Lsmeans values of each traits. After correction by the trial effect, no significant correlation was found ($r^2 = 0.004$, $p = 0.95$, Pearson correlation) (**Fig. S1**).

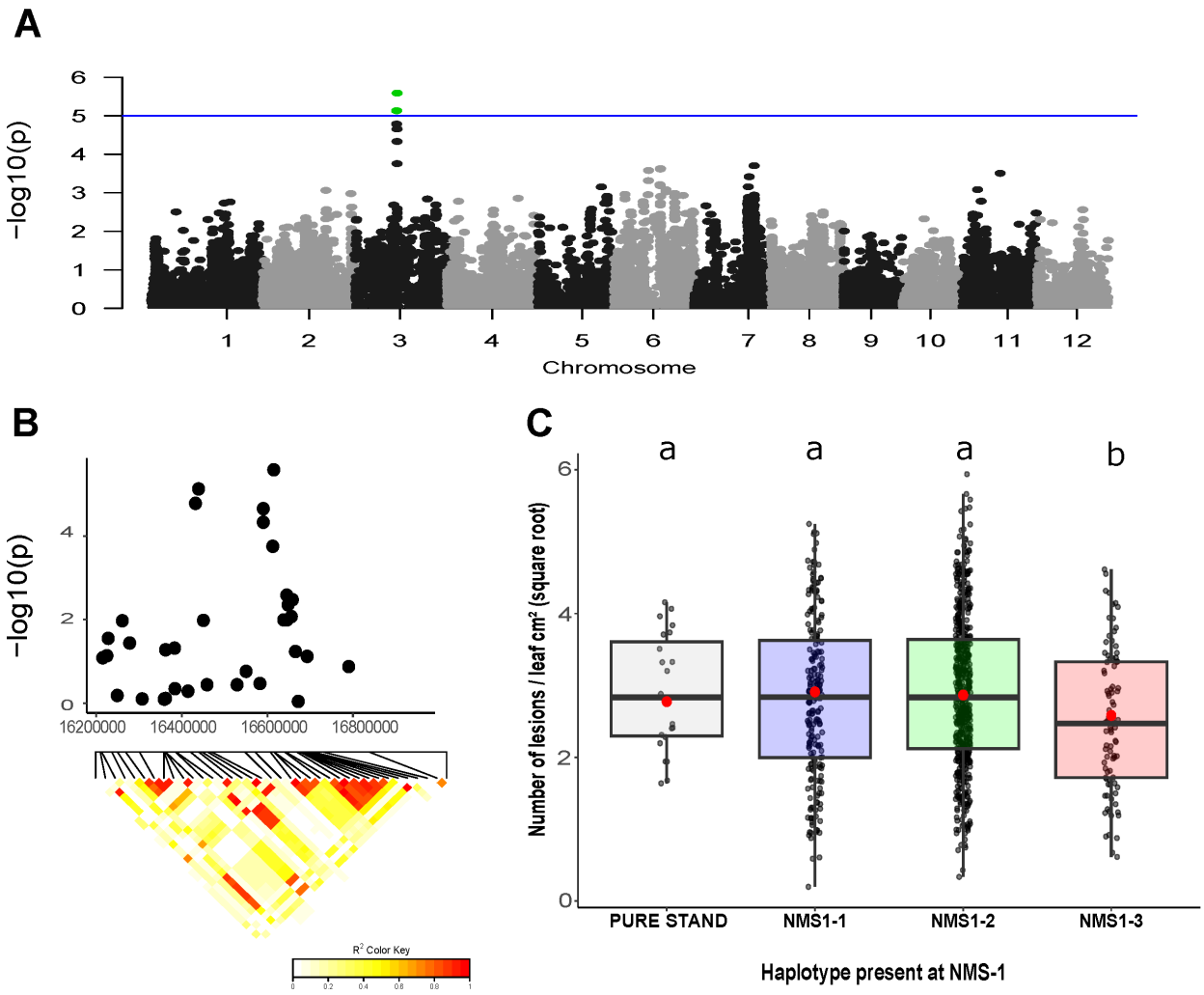


Figure.2 : GWA analysis of the modulation by conspecific neighbours of blast susceptiblity in focal rice Kitaake.

The susceptibility to the rice blast fungus was measured in Kitaake grown in the presence of 280 different neighbours. This phenotype of modulation of susceptibility was used to identify loci in the neighbour that control this modulation in the focal Kitaake plant.

A) *Manhattan plots* from genome-wide association mapping of rice blast susceptibility on Kitaake grown with intraspecific neighbours. GWA studies have been performed on BLUP calculated on the mixed model presented in methods. The Y-axis represents -log10(pvalue) and X-axis indicates the position of the SNP on the chromosome based on the Nipponbare reference genome. Green points indicate significant SNPs with -log10(P) ≥ 5.

B) Genetic details of the *NMS1* locus in neighbour plants that controls the modulation of susceptibility to blast fungus in Kitaake. Black dots show p-values for SNPs identified in GWAS. Heatmap shows the extent of Linkage Desiquilibrium (LD) established by R^2 calculation between each SNPs. The QTL is established for an entire LD block containing significant SNPs. *NMS1* locus was ~ 250 Kpb (16,414 Mpb − 16,665 Mpb) on chromosome 3.

C) Disease susceptibility of Kitaake grown with intraspecific neighbours with various haplotype at the *NMS1* locus. The data are extracted from the phenotyping studies presented in Fig.1. Black dots represented the Lsmeans of each neighbour effect on Kitaake susceptibility. The red dots represent the Lsmeans of the dataset establlished with the linear model described in Methods. Letter indicates significative difference according to ANOVA test following by a Tukey HSD test (p.value < 0.05).

A single genetic locus in neighbours modulate susceptibility in focal plants

We then performed an original GWA analysis for each phenotype (modulation of susceptibility or biomass) to look for association with SNPs in the neighbours. Heritability was higher for biomass ($h^2 = 0.36$) than for disease susceptibility ($h^2 = 0.24$); however we did not find genetic region associated with the modification of biomass of Kitaake by its neighbours (**Fig. S2**).

For disease susceptibility in focal Kitaake, we found one genomic region in the neighbour genotype, defined by 5 significant or sub-significant SNPs, that was associated with a modification. This region, that we termed *NMS1*, is located in an LD block of 251 Kb on chromosome 3 (**Fig. 2 A-B**). We could identify three haplotypes for *NMS1* using the twenty SNPs present at this locus. In our data set of 279 neighbours, 70, 177 and 32 were respectively from *NMS1-1, NMS1-2* and *NMS1-3* haplotype. The number of lesions on Kitaake was significantly reduced ($p<0.05$, tukey test) by 22% when the neighbour haplotype was *NMS1-3* compared to the two other haplotypes and by 20% compared to pure stand (**Fig. 2C**).
In order to validate the *NMS1* locus, we selected from the 3K genome database (Li *et al.*, 2014) a list of 42 new temperate japonica genotypes based on their *NMS1* haplotype (**Table S2**). The susceptibility of Kitaake in the presence of these 42 previously unknown genotypes was evaluated (see methods). This confirmed that disease susceptibility of Kitaake neighboured by plants harbouring *NMS1-3* haplotype was significantly reduced compared to *NMS1-2* and *NMS1-1* ($p<0.05$, tukey test) (**Fig. S3**).

When examining the genetically defined *NMS1* locus on chromosome 3, we identified 37 coding sequence based on the reference genome Nipponbare (**Table S4**). In order to further define the *NMS1* locus, we calculated for each SNP position of the *NMS1* locus, using the 3K genome database, the percentage of accessions sharing the same SNP than the *NMS1-3* haplotype (**Fig. S4**). We could narrow down the probable *NMS1-3* locus to two small intervals on chromosome 3 where less than 30% of the 3K genome varieties share the same allele for each position. These two intervals contain 13 sequences coding for genes (**Table S5**).

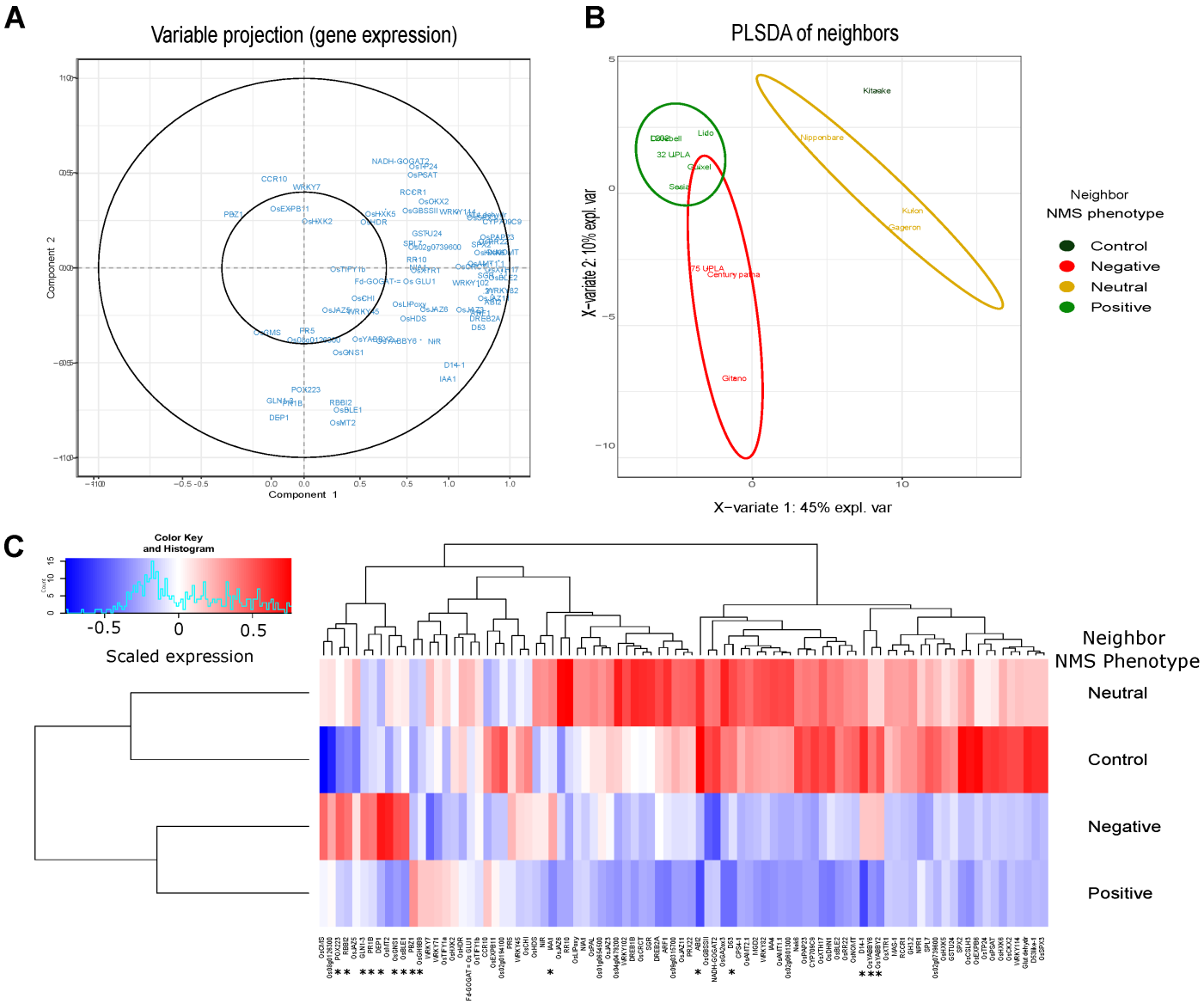


Figure.3 : Transcriptome profile analysis of Kitaake grown with contrasted conspecific neighbours.

Gene expression was measured in leaves of Kitaake grown in pure stand (control) or in mixture with 12 intraspecific neighbours selected (see text). Neighbours have been grouped in three categories according to the NMS phenotype they trigger: neutral, negative (increase of susceptibility) and positive (reduction of susceptibility) (See Table S6). Gene expression was measured without infection after 3 weeks of growing. The expression of each gene measured by Fluidigm Quantitative RT-PCR (see methods) was normalized using 3 independants house-keeping genes (EF1a, EF4a and UBQ5). Data are visualised on a **(A)** Principal component analysis of all genes for the four groups of neighbours. PCA has been done on all genes but only 50 (with a contribution higher than 0.3) are presented here to limit overlap. **(B)** PLSDA clustering of the 4 groups of neighbours. **(C)** heatmap of scaled gene expression and hierarchical clustering depending the NMS phenotype of the neighbour.

Neighbours induce large and characteristic transcriptional changes in focal Kitaake plants

In order to explore the transcriptional responses associated with NMS, we selected 12 neighbours triggering either an increase or a decrease of susceptibility in Kitaake. We purposely excluded *NMS1-3* neighbours for which a specific analysis will be conducted. We selected three types of neighbours depending on their effect on disease susceptibility (**Fig. 1A**) that were later considered as groups of neighbours: 6 neighbours inducing a reduction (positive group), 3 neighbours an increase (negative group) and 3 neighbours no change on disease susceptibility in Kitaake (**Table S6**). We then analysed the expression of 92 genes known to be transcriptionally regulated in different physiological processes (**Table S3**). Hence, we monitored gene expression in focal Kitaake in response to the 12 selected neighbours, in addition to pure stand control, at the stage where plants are normally inoculated (**Fig. 3**). PLSDA clustering indicated that gene expression separates neighbours according to their impact on disease susceptibility in Kitaake, with negative and positive neighbours on the one hand and neutral neighbours and pure stand on the other (**Fig. 3A B**). Thus, neighbours inducing similar NMS changes induced similar transcriptional changes in Kitaake. Therefore, for later Heatmap analysis, we considered the expression pattern of the groups (positive, negative and neutral) of neighbours rather than of individual neighbours. Heatmap clustering (**Fig. 3C**) of gene expression data showed that neutral neighbours and pure stand control provoked similar patterns of expression in Kitaake focal plants. In strong contrast, in the presence of neighbours from both negative and positive groups, Kitaake plants showed a massive down-regulation of most genes compared to neutral neighbours and pure stand control.

When comparing positive and negative neighbour genotypes, a group of 10 genes (Os08g0126300, OsCMS, POX223, RBBI2, OsMT2, GLN1-3, PR1B, DEP1, OsGNS1, OsBLE1) were more expressed in negative neighbours. Two genes (PBZ1 and OsGH9B9) were the only genes to be more expressed in positive neighbours compared to other class of neighbours. Finally, the expression of 9 genes (D53, OsDHN1, ABI2, YABI6, YABI2, D14, DREB2A, ARF1 and Os01g0654500) was specifically reduced in Kitaake exposed to positive neighbour compared to the three other groups of neighbour.

Discussion

In contrast to many other environmental factors that have been deeply scrutinized over the years (Colhoun, 1973; Bashir *et al.*, 2019; Nobori & Tsuda, 2019), plants as such have been neglected as factors that influence disease susceptibility in their neighbourhood, both in terms of genetic control and molecular response (Subrahmaniam *et al.*, 2018). One of the first empirical evidence that part of one plants' phenotype variation may lie outside of this plant was found in Arabidopsis (Mutic & Wolf, 2007), where it was shown that several loci in neighbour plants could modulate the size, reproduction and other developmental traits in their neighbourhood. Here we show that in rice, a single genomic region in the neighbour can modulate disease susceptibility in its neighbourhood, expanding to pathogen resistance the range of phenotypes for which variations may lie outside the plant itself. Indeed, Kitaake plants growing with neighbours harbouring the *NMS1-3* haplotype at this locus displayed a 20% reduction of disease. Genome sequence analysis indicates that Kitaake has the *NMS1-1* haplotype, suggesting that we probably did not find a locus associated with an altruistic behaviour (Gardner, 2019a). It is noteworthy that the range of modification of susceptibility was at least 2-fold higher than the one on biomass. Considering that most previous studies focused on the impact of intra-specific neighbours on biomass (Kigathi *et al.*, 2013; Bowsher *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2020), our finding is advocating for a more systematic evaluation of NMS in competition experiments.

While neighbours with *NMS1-3* haplotype can reduce susceptibility in focal plants, neighbours having similar effects on focal plants were identified in the two other haplotypes at *NMS1*, suggesting that there are several ways to modulate susceptibility that remain to be identified. In order to examine how focal plants could react to these possible different ways of triggering NMS, we examined the transcriptional responses of Kitaake to neighbours triggering all possible NMS phenotypes (positive, negative or neutral). All neighbours tested provoked strong transcriptional changes compared to pure stand control. This finding is a first large scale evidence, besides available scare reports (Bowsher *et al.*, 2017; Subrahmaniam *et al.*, 2018), that plants can affect transcription in their conspecific neighbours. Quite surprisingly, whether increasing or reducing NMS, the neighbours tested all induced massive pattern of down-regulation of gene expression compared to neutral or pure stand controls. This suggests a core response mechanism to NMS neighbours, irrelevantly of the disease susceptibility phenotype, with possible but yet uncharacterized physiological effects.

Genes related to defence such as *PBZ1*, already identified as markers of the NMS in previous study (Pélissier *et al.*, 2021a) and *OsGH9B9,* a marker of secondary cell wall defence (Xie *et al.*, 2013) were more expressed suggesting that mechanical defence and hyper sensitive response can be induced in Kitaake by neighbours reducing susceptibility. Additionally to this result, Kitaake plants in contact with neighbours increasing susceptibility overexpressed a group of 10 genes including *OsMT2* and *OsGNS1, a* pattern which is consistent with their down-regulation in resistance. However other defence genes like *OsCMS*, *POX223*, *RBBI2* or *PR1B* which are usually up-regulated during resistance to *M. oryzae* (Vergne *et al.*, 2010) were also up-regulated in Kitaake subjected to negatives neighbours. Thus, immunity-related genes show inconsistent expression patterns with observed NMS phenotypes and confirm our hypothesis that immunity is probably not the only driver of NMS (Pélissier *et al.*, 2021a).

When looking for specific transcriptional changes in Kitaake plants in contact with neighbours reducing susceptibility, we mostly found genes that were repressed. We found that key marker genes of the abscissic acid (*ABI2*) and auxin (*IAA1*) pathways were repressed. Since ABA and auxins are generally shown to trigger susceptibility to blast in rice (De Vleesschauwer *et al.*, 2013b, 2014), the observed expression patterns of *ABI2* and *IAA1* are consistent with a role of these hormones in NMS. The *D14* gene, which is seen as a positive marker of strigolactone concentration (Arite *et al.*, 2009) was less expressed in Kitaake grown with positive neighbours; this is not consistent with the idea that strigolactones, that are known to promote resistance to *M. oryzae* (Nasir *et al.*, 2019), are contributing to this case of NMS.

Interestingly, *DEP1* was induced in Kitaake grown with negative neighbours, together with other genes related to growth (*OsBLE1*, *GLN1-3)* whereas other growth genes were repressed in Kitaake grown with positive neighbours (YABBY2 & YABBY6). Since in rice a growth trade-off is mediated by a balance of induction of defence genes and growth genes like *DEP1* (Wang *et al.*, 2018), a deeper analysis of the possible connections between growth and NMS needs to be explored.

From previous results suggesting a root signal between plants in NMS (Pélissier *et al.*, 2021a), we were expecting to find, in the genetic loci triggering NMS by neighbours, genes related with signalling in the *NMS1* locus. However, we did not find any gene coding for the biosynthesis of a molecule that could be an NMS signal. Alternatively, *NMS1* in the neighbour plant could code for a function that alters the focal's root environment and consequently its functioning. The *OsSPX5* gene in *NMS1* locus could represent such an indirect mechanism explaining NMS. Indeed *OsSPX* genes play a key role in phosphorous assimilation, signalling and homeostasis

in rice (Wu *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). Since an excess of phosphorous increases disease susceptibility to *M. oryzae* (Campos-Soriano *et al.*, 2020), differential accumulation/exudation of phosphorous by *OsSPX5* could explain NMS. In that context, it will be interesting to analyse what does *NMS1-3* locus itself confers to plants harbouring this allele and more generally what does this haplotype provoke in the rhizosphere to understand how this locus can trigger NMS.

Our study demonstrates that plants can massively alter transcription in their plant conspecific neighbours, although these changes still remain to be fully understood. Additionally, we identified the *NMS1* locus that can provoke a measurable and significant indirect genetic effect in rice susceptibility to the blast fungus. The functional characterization of the *NMS1* locus remains to be made to fully understand how a neighbour plant can trigger such changes in its neighbourhood. Overall, our findings open the way to genetic improvement of intra-specific mixtures for which there is a renewed attention (Borg *et al.*, 2018) but for which genetic selection of individual components remains a challenge (Litrico & Violle, 2015).

References

Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyozuka J. **2009**. d14, a Strigolactone-Insensitive Mutant of Rice, Shows an Accelerated Outgrowth of Tillers. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1416–1424.

Bashir K, Matsui A, Rasheed S, Seki M. **2019**. Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought, salinity, heat, and cold stress. *F1000Research* **8**: F1000 Faculty Rev-658.

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. **2015**. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**: 1–48.

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun M-H, Tharreau D. **2003**. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1139–1147.

Biedrzycki ML, L V, Bais HP. **2011**. Transcriptome analysis of Arabidopsis thaliana plants in response to kin and stranger recognition. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1515–1524.

Borg J, Kiær LP, Lecarpentier C, Goldringer I, Gauffreteau A, Saint-Jean S, Barot S, Enjalbert J. **2018**. Unfolding the potential of wheat cultivar mixtures: A meta-analysis perspective and identification of knowledge gaps. *Field Crops Research* **221**: 298–313.

Bowsher AW, Shetty P, Anacker BL, Siefert A, Strauss SY, Friesen ML. **2017**. Transcriptomic responses to conspecific and congeneric competition in co-occurring Trifolium. *Journal of Ecology* **105**: 602–615.

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. **2007**. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **23**: 2633–2635.

Campos-Soriano L, Bundó M, Bach-Pages M, Chiang S-F, Chiou T-J, Segundo BS. **2020**. Phosphate excess increases susceptibility to pathogen infection in rice. *Molecular Plant Pathology* **21**: 555–570.

Cohen SP, Leach JE. **2019**. Abiotic and biotic stresses induce a core transcriptome response in rice. *Scientific Reports* **9**: 6273.

Colhoun J. **1973**. Effects of Environmental Factors on Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* **11**: 343–364.

Courtois B, Frouin J, Greco R, Bruschi G, Droc G, Hamelin C, Ruiz M, Clément G, Evrard J-C, Coppenole S van, *et al.* 2012. Genetic Diversity and Population Structure in a European Collection of Rice. *Crop Science* **52**: 1663–1675.

De Vleesschauwer D, Gheysen G, Höfte M. **2013**. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science* **18**: 555–565.

De Vleesschauwer D, Xu J, Höfte M. **2014**. Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Delteil A, Blein M, Faivre-Rampant O, Guellim A, Estevan J, Hirsch J, Bevitori R, Michel C, Morel J-B. **2012**. Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. *Molecular Plant Pathology* **13**: 72–82.

Dudley SA. **2015**. Plant cooperation. *AoB PLANTS* **7**.

Endelman JB, Jannink J-L. **2012**. Shrinkage Estimation of the Realized Relationship Matrix. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **2**: 1405–1413.

Frouin J, Languillaume A, Mas J, Mieulet D, Boisnard A, Labeyrie A, Bettembourg M, Bureau C, Lorenzini E, Portefaix M, *et al.* 2018. Tolerance to mild salinity stress in japonica rice: A genome-wide association mapping study highlights calcium signaling and metabolism genes. *PLOS ONE* **13**: e0190964.

Gallet R, Fontaine C, Bonnot F, Milazzo J, Tertois C, Adreit H, Ravigné V, Fournier E, Tharreau D. **2015**. Evolution of Compatibility Range in the Rice−Magnaporthe oryzae System: An Uneven Distribution of R Genes Between Rice Subspecies. *Phytopathology*® **106**: 348–354.

Gardner A. **2019**. The greenbeard effect. *Current Biology* **29**: R430–R431.

Kigathi RN, Weisser WW, Veit D, Gershenzon J, Unsicker SB. **2013**. Plants Suppress Their Emission of Volatiles When Growing with Conspecifics. *Journal of Chemical Ecology* **39**: 537–545.

Kumar A, Duijnen R van, Delory BM, Reichel R, Brüggemann N, Temperton VM. **2020**. Barley shoot biomass responds strongly to N:P stoichiometry and intraspecific competition, whereas roots only alter their foraging. *bioRxiv*: 2020.01.20.912352.

Lê Cao K-A, Boitard S, Besse P. **2011**. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* **12**: 253.

Li J-Y, Wang J, Zeigler RS. **2014**. The 3,000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. *GigaScience* **3**.

Litrico I, Violle C. **2015**. Diversity in Plant Breeding: A New Conceptual Framework. *Trends in Plant Science* **20**: 604–613.

Livak KJ, Schmittgen TD. **2001**. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods* **25**: 402–408.

Mansueto L, Fuentes RR, Borja FN, Detras J, Abriol-Santos JM, Chebotarov D, Sanciangco M, Palis K, Copetti D, Poliakov A, *et al.* 2017. Rice SNP-seek database update: new SNPs, indels, and queries. *Nucleic Acids Research* **45**: D1075–D1081.

Masclaux FG, Bruessow F, Schweizer F, Gouhier-Darimont C, Keller L, Reymond P. **2012**. Transcriptome analysis of intraspecific competition in Arabidopsis thaliana reveals organ-specific signatures related to nutrient acquisition and general stress response pathways. *BMC Plant Biology* **12**: 227.

Mutic JJ, Wolf JB. **2007**. Indirect genetic effects from ecological interactions in Arabidopsis thaliana. *Molecular Ecology* **16**: 2371–2381.

Nasir F, Tian L, Shi S, Chang C, Ma L, Gao Y, Tian C. **2019**. Strigolactones positively regulate defense against Magnaporthe oryzae in rice (Oryza sativa). *Plant Physiology and Biochemistry* **142**: 106–116.

Ninkovic V. **2003**. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1931–1939.

Nobori T, Tsuda K. **2019**. The plant immune system in heterogeneous environments. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 58–66.

Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M. **2017**. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science* **8**.

Pélissier R, Buendia L, Brousse A, Temple C, Ballini E, Fort F, Violle C, Morel J-B. **2021a**. Plant neighbour-modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures. *Journal of Experimental Botany*.

Pélissier R, Violle C, Morel J-B. **2021b**. Plant immunity: Good fences make good neighbors? *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102045.

Pierik R, Mommer L, Voesenek LA. **2013**. Molecular mechanisms of plant competition: neighbour detection and response strategies (D Robinson, Ed.). *Functional Ecology* **27**: 841–853.

Saijo Y, Loo EP. **2020**. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist* **225**: 87–104.

Scheres B, van der Putten WH. **2017**. The plant perceptron connects environment to development. *Nature* **543**: 337–345.

Shameer K, Naika MBN, Shafi KM, Sowdhamini R. **2019**. Decoding systems biology of plant stress for sustainable agriculture development and optimized food production. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **145**: 19–39.

Shi J, Hu H, Zhang K, Zhang W, Yu Y, Wu Z, Wu P. **2014**. The paralogous SPX3 and SPX5 genes redundantly modulate Pi homeostasis in rice. *Journal of Experimental Botany* **65**: 859–870.

Subrahmaniam HJ, Libourel C, Journet E-P, Morel J-B, Muños S, Niebel A, Raffaele S, Roux F. **2018**. The genetics underlying natural variation of plant–plant interactions, a beloved but forgotten member of the family of biotic interactions. *The Plant Journal* **93**: 747–770.

Tsuda K, Somssich IE. **2015**. Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* **206**: 932–947.

Vannier N, Agler M, Hacquard S. **2019**. Microbiota-mediated disease resistance in plants. *PLOS Pathogens* **15**: e1007740.

Vergne E, Ballini E, Droc G, Tharreau D, Nottéghem J-L, Morel J-B. **2008**. ARCHIPELAGO: A Dedicated Resource for Exploiting Past, Present, and Future Genomic Data on Disease Resistance Regulation in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **21**: 869–878.

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D, Nottéghem J-L, Morel J-B. **2010**. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen Magnaporthe oryzae. *BMC Plant Biology* **10**: 206.

Wang J, Zhou L, Shi H, Chern M, Yu H, Yi H, He M, Yin J, Zhu X, Li Y, *et al.* 2018. A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice. : 4.

Wu P, Shou H, Xu G, Lian X. **2013**. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 205–212.

Xie G, Yang B, Xu Z, Li F, Guo K, Zhang M, Wang L, Zou W, Wang Y, Peng L. **2013**. Global Identification of Multiple OsGH9 Family Members and Their Involvement in Cellulose Crystallinity Modification in Rice. *PLoS ONE* **8**: e50171.

Zhou Z, Wang Z, Lv Q, Shi J, Zhong Y, Wu P, Mao C. **2015**. SPX proteins regulate Pi homeostasis and signaling in different subcellular level. *Plant Signaling & Behavior* **10**: e1061163.

Supplementary figures

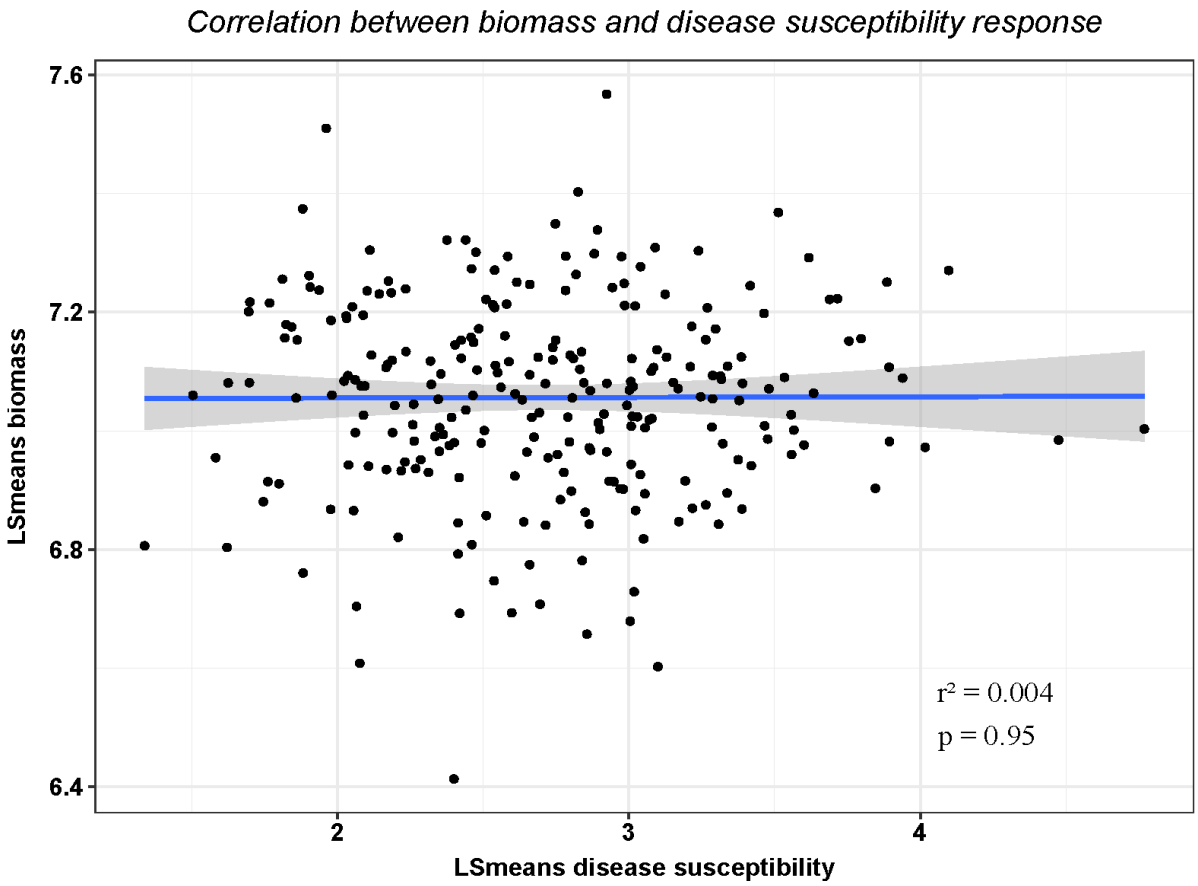


Figure S1. Relation between disease susceptibility and biomass of Kitaake grown with conspecific neighbours.

Lsmeans values for each phenotypes were calculated on the linear models described in methods. Each point represents the Lsmeans of the disease susceptibility and Lsmeans of the biomass of Kitaake in the presence of a specific neighbour. Only neighbours with a value for disease susceptibility and biomass were used for the plot and correlation calculation (x=254). Person correlation were calculated and R^2 and p.value are shown.

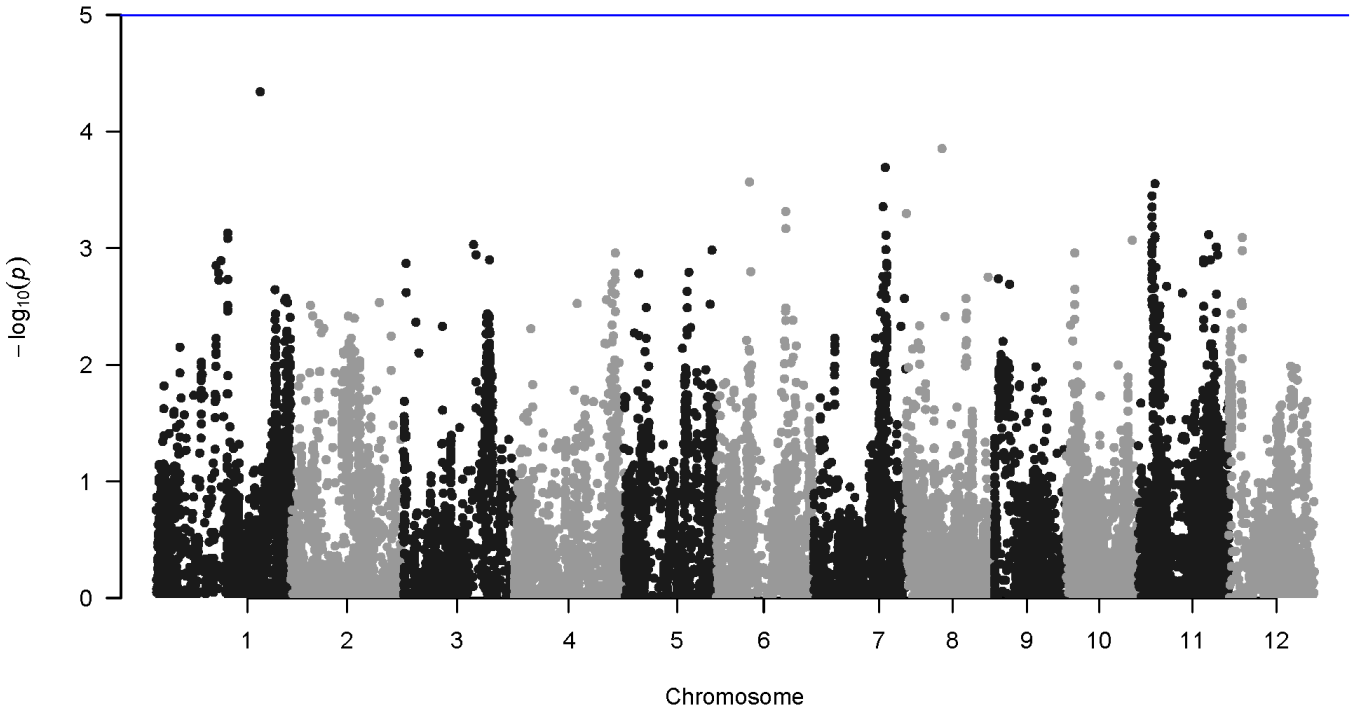


Figure S2. GWA analysis of the modulation of biomass in focal rice Kitaake by conspecific neighbours.

The biomass of Kitaake grown in the presence of 280 different neighbours was measured. This phenotype of modulation of biomass was used to identify loci in the neighbour that control this modulation in the focal Kitaake plant. GWA studies have been performed on BLUP calculated on the mixed model presented in methods. The Y-axis represents -log10(pvalue) and X-axis indicates the position of the SNP on the chromosome based on the Nipponbare reference genome.

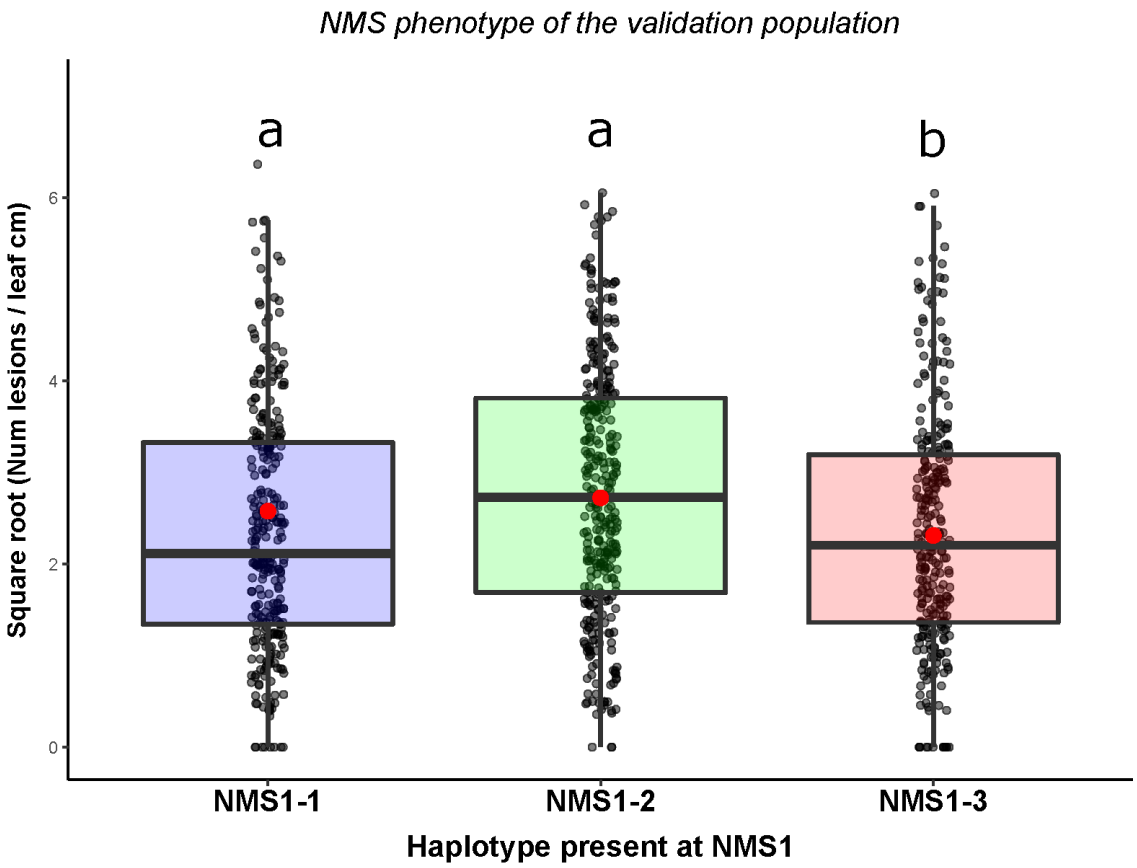


Figure S3. Disease susceptibility of Kitaake grown with conspecific neighbours according to their *NMS1* haplotype

A total of 42 genotypes, distinct from the intital 280 genotypes used for GWAS, were selected from the 3000 genomes for validation of the QTL based on their *NMS1* haplotype (13 genotypes for NMS1-1, 15 genotypes for NMS1-2 and 14 genotypes for NMS1-3) (**Sup table.3**).We performed the same experience of inoculation than for the initial phenotyping, as described in methods. Each black point represents the means of repetitions of the effect of neighbours on Kitaake' susceptibility. At least 6 repetitions of each association Kitaake-Neighbour were done. The red dots represent the Lsmeans of the dataset establlished with the linear model described in Methods. Letter indicate significative difference according to ANOVA test following by a Tukey HSD test (p.value < 0.05).

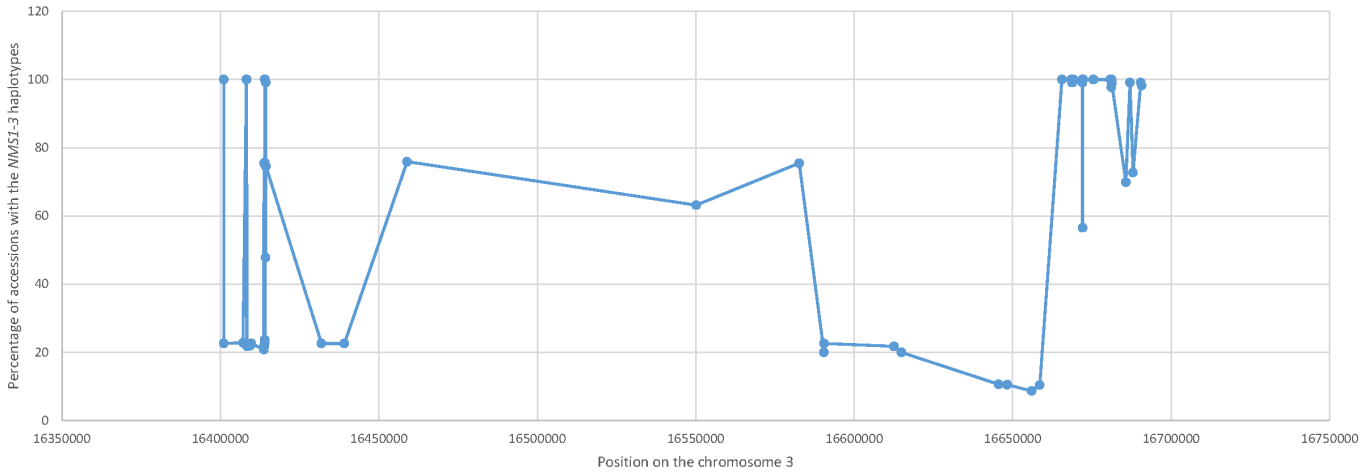


Figure S4. Percentage of markers shared by all the genotypes from the 3000 genome database at the *NMS1* locus

Percentage has been estimated for each marker in the consensus sequence of the *NMS1-3* haplotype in the 3000 genomes database.

Supplementary tables

All additional tables are available in **Annexe.2**

Table S1. List of the 280 rice genotypes used in this study

Table S2. List of the 42 rice genotypes used as validation set. Genotypes have been selected for their NMS1 haplotypes classification

Table S3. List of the 92 genes, process targeted, reference and primers used in this study

Table S4. Total gene list present in the NMS1 QTL

Table S5. Gene list and function present in the NMS1 QTL two intervals Gene functions, expression and localization fromFunRiceGenes and rice Xpro and rice database.

Table S6. List of the 13 genotype used for the fluidigm gene expression analysis

Discussion générale

I. Rappel des objectifs et principaux résultats

Alors que la réintroduction de diversité génétique dans nos systèmes agronomiques montre de bons résultats en terme d'augmentation de la production (Reiss & Drinkwater, 2018), de réduction des intrants chimiques (Gaba *et al.*, 2015) et de durabilité des systèmes (Bommarco *et al.*, 2013), elle permet aussi une meilleure gestion des maladies (Raboin *et al.*, 2012; Kristoffersen *et al.*, 2020). Cependant, au-delà des effets des mélanges de variétés sur la reproduction et la dispersion des agents pathogènes, bien identifiés en conditions naturelles (Mundt 2002; Gaba *et al.*, 2015), nos connaissances sur l'impact des interactions plante – plante sur la physiologie des plantes, notamment sur leur sensibilité aux agents pathogènes, restent limitées.

Ce travail de thèse visait donc à mieux comprendre les interactions intra-spécifiques et leurs effets sur la sensibilité des plantes. Dans l'optique de permettre à l'agriculture d'utiliser les interactions plante-plante comme levier contre les maladies des grandes cultures, nous les avons étudiés chez deux cultures d'intérêt agronomique majeure : le riz et le blé. Nous avons assemblé des couples de génotypes deux à deux et les avons inoculés avec des agents pathogènes foliaires majeurs. En réalisant des séries d'expériences en conditions contrôlées, nous avons pu analyser les déterminants génétiques, physiologiques et moléculaires de la sensibilité d'une plante focale en présence d'une plante voisine de la même espèce. L'ensemble de ces résultats nous a amené à identifier et nommer un nouveau phénomène, la NMS (Neighbour-Modulated Susceptibility) qui désigne la modification, par le biais d'interactions plante-plante, de la sensibilité d'une plante focale par son voisinage végétal.

Premièrement, en sélectionnant 10 ou 12 génotypes dans quatre populations de riz ou de blé avec des historiques de sélection différents, nous avons testé si nous pouvions détecter une modification de sensibilité par le voisinage dans nos conditions expérimentales. En se basant sur l'analyse des 402 associations que nous avons testées, en les comparant à leur sensibilité en culture pure, nous avons pu observer que les interactions plante-plante impactaient la sensibilité des mélanges dans chacune des populations testées et pour la grande majorité des pathogènes testés. De plus nous avons identifié que les effets d'interactions spécifiques (DGExIGE) expliquaient un pourcentage de variance plus important que les effets de voisinage globaux (IGE). Enfin nous avons observé que ni la distance génétique entre les génotypes voisins, ni la sensibilité du voisinage, n'influaient sur les phénomènes de NMS dans les populations que nous avons testées. Néanmoins les populations où les génotypes avaient un historique de sélection

commun et moins dirigé, semblaient plus enclines à développer de la NMS (IGE et DGExIGE fortes).

Dans un second temps, l'analyse fine de deux couples de génotypes de riz et de blé nous a permis d'apporter des précisions sur les mécanismes gouvernant la NMS. Tout d'abord, nous avons identifié qu'un même génotype voisin pouvait avoir des effets différents et même opposés sur la sensibilité d'une plante focale en fonction de l'agent pathogène considéré. De plus nous avons prouvé que la NMS nécessitait une interaction entre les deux génotypes voisins dans le sol, mais qu'elle ne nécessitait pas en revanche que le génotype voisin soit malade. Ce dernier résultat est un résultat important car il montre que la NMS est un phénomène constitutif et non inductible, par une attaque par exemple. Les mesures de physiologique moléculaire avant et après inoculation par l'agent pathogène ont confirmé ce résultat en montrant que la seule présence d'une plante voisine pouvait induire des modifications de concentration de certains acides aminés et modifier l'expression des gènes de défenses.

Enfin, dans l'optique d'identifier les déterminants génétiques associés au phénomène de NMS, nous avons réalisé une expérience où nous avons associé, un par un, 280 génotypes voisins avec le génotype Kitaake. Cette expérience nous a permis de confirmer et d'observer que la sensibilité, ainsi que la biomasse aérienne d'une seule plante focale (Kitaake), pouvaient être significativement impactées par le voisinage, positivement ou négativement. En pratiquant une étude d'association pangénomique (« GWAS ») associant le génome du génotype voisin à la sensibilité du génotype Kitaake, nous avons pu identifier une zone sur le génome des génotypes de riz japonica tempéré associée au déclenchement de la NMS. Nous avons appelé ce locus du chromosome 3 « *NMS1* ». Dans cette zone, nous avons identifié 3 séquences consensus différentes dont une induisant une réduction de 22% du nombre de symptômes chez Kitaake lorsqu'elle était présente dans le génotype voisin. Suite à cette expérience, et dans le but de mieux cerner l'ensemble des modifications d'une plante focale dans la NMS, nous avons choisi un échantillon de voisins ayant des effets contrastés sur la sensibilité de Kitaake et dont nous avons analysés les effets sur Kitaake. Nous avons pu identifier des patrons d'expression permettant de distinguer les voisins n'ayant pas d'effet sur le génotype Kitaake de ceux qui avaient un effet. Parmi les génotypes voisins montrant un effet sur la sensibilité de Kitaake,

sans identifier de processus précis impliqués, nous avons pu distinguer deux profils d'expression différenciant les voisins ayant un impact négatif de ceux avec un impact positif.

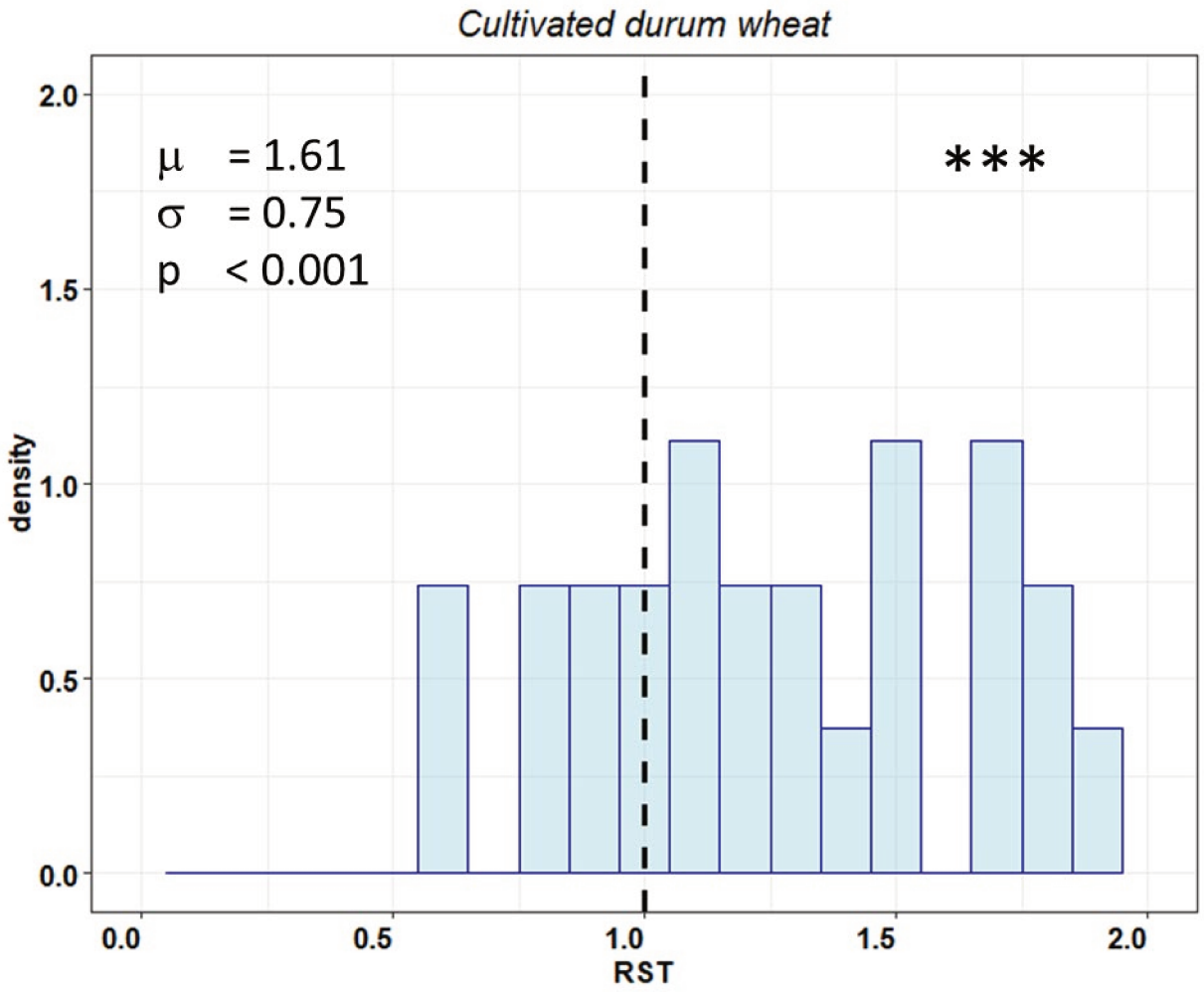


Figure 16. Distribution du RST dans une population de blés cultivés inoculés avec l'agent pathogène de la septoriose *Z. tritici*

Une matrice de mélanges deux à deux de 10 génotypes a été réalisée, dans laquelle toutes les combinaisons ont été effectuées. Les mélanges ont été inoculés avec Z. tritici comme décrit dans le chapitre 2. L'indice RST (moyenne de sensibilité du mélange / moyenne de sensibilité des deux culture pures associées) a été calculé comme décrit dans le chapitre 1 en prenant les rapport nombres de pycnides/surface malade comme variable représentant la sensibilité des plantes. La distribution de l'index RST, la moyenne (μ) et l'écart type (σ) sont rapportés. Une étoile indique un RST significativement différent de 1 selon un t test ($p<0.05$). Source: A. Ducasse, communication personnelle (Equipe MOMIE de l'UMR PHIM).

II. Quels sont les mécanismes pouvant être à l'origine de la NMS dans les mélanges variétaux?

Ces trois dernière années, l'analyse des réponses des plantes au voisinage intra-spécifique nous a permis de mettre en évidence une nouvelle modification induite par le voisinage : La NMS. Cependant, l'étude interroge sur les mécanismes de déclenchement et de réponses mis en jeu.

En effet, à première vue le chapitre 1 semble suggérer que la NMS augmente globalement la sensibilité du riz à ses différents pathogènes alors que le phénomène semble diminuer la sensibilité du blé à la rouille brune. Or, comme présenté dans le chapitre 2 pour le couple de génotype Cultur/Atoudur, la sensibilité globale à l'agent pathogène *Zymoseptoria tritici* de mélanges de blé peut être augmentée en conditions contrôlées (**Figure.16**). Dès lors il faut considérer que la NMS peut, selon l'agent pathogène, favoriser ou limiter son développement. Ce type de résultat peut laisser penser que les plantes voisines modifient des mécanismes globaux au sein des plantes focales, en modifiant par exemple leur balance hormonale, ce qui favorise certains agents pathogènes plutôt que d'autres. Cette vision de la NMS serait cohérente avec nos observations réalisées dans le chapitre 2 où nous voyons que la NMS induit des effets opposés sur la sensiblité de Kitaake aux deux pathogènes *M. oryzae* et *B. oryzae* lorsqu'il est en présence du génotype Lido. Or, nos résultats indiquent aussi que d'autres génotypes montrent des effets similaires d'un même voisin sur leur sensibilité à différents agents pathogènes (Cf Chapitre 1, sensibilité à *B. oryzae* et *M. oryzae* de Nipponbare augmentée par la présence de Baldo363). Ces observations ne sont donc pas toutes cohérentes avec une hypothèse d'antagonisme des mécanismes de résistance entre agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes. Ceci suggère que le phénomène de NMS est lié à une interaction tri partite entre plante focale, plante voisine et l'agent pathogène et nous montre que sa régulation est complexe.

Concernant les réponses en lien avec la NMS, nos expériences montrent que la NMS est associée à une modification des profils transcriptomiques dans les plantes focales. Cette modification peut inclure une modulation de l'immunité, parfois importante comme chez le riz par exemple, ou faible chez le blé. De plus, la NMS peut dans certains cas être accompagnée d'un changement de la concentration en acides aminés chez le riz.

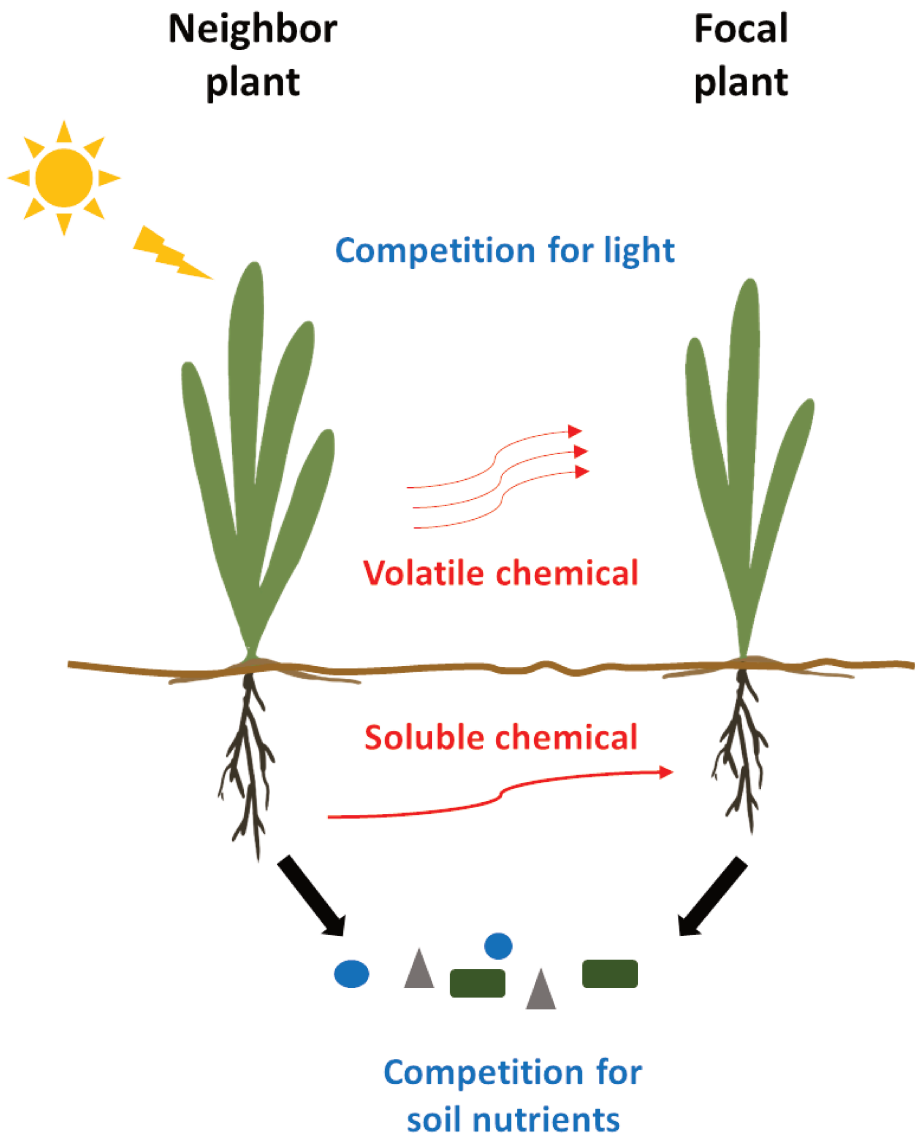


Figure 17. Le voisin végétal: la combinaison d'un stress biotique et abiotique

Exemples non exhaustifs de signaux émis par une plante voisine et captés par une plante focale pouvant être interprétés comme des stress biotiques (en rouge) ou abiotiques (en bleu). Les signaux peuvent provenir du compartiment aérien, souterrain ou les deux.

Bien que l'ensemble de nos expériences se concentre sur les réponses des plantes focales, nous avons aussi identifié qu'une interaction dans le sol entre les génotypes était nécessaire au déclenchement de la NMS. Nos analyses montrent par ailleurs que l'émission d'un « signal » peut être effectuée par des voisins sains, ce qui en fait un signal constitutif. A l'échelle génomique, une zone a été identifiée sur le génome du voisin qui, lorsqu'elle est sous une certaine forme haplotypique, déclenche des effets positifs de NMS (réduction de la sensibilité). Néanmoins d'autres voisins peuvent aussi avoir des effets positifs de NMS sans pour autant posséder l'haplotype en question.

L'ensemble de nos résultats plaide donc pour une addition de plusieurs mécanismes pouvant déclencher la NMS ainsi qu'à l'existence de plusieurs façons de répondre à ces déclenchements plutôt que pour des mécanismes de déclenchement et de réponses uniques.

La NMS observée dans les mélanges intra-spécifiques de riz et de blé pourrait être expliquée par les différentes perturbations de l'environnement créés par un voisin végétal **(Figure.17)**. La classification habituelle range les perturbateurs de la physiologie des plantes en fonction de leur nature : biotique (lié aux êtres vivants) ou abiotique (lié au milieu, indépendant des êtres vivants) (Shabala, 2017). Néanmoins, les voisins végétaux peuvent entrer dans ces deux catégories : par leur nature d'être vivant et leur sécrétions notamment, ils constituent un perturbateur biotique (Schmid *et al.*, 2013) et par ailleurs, les plantes, en se développant, modifient leur environnement proche en altérant notamment la disponibilité des ressources (lumineuse par exemple) (Pierik *et al.*, 2013) et peuvent donc être aussi considérées comme un stress abiotique pour leur voisine. L'ensemble de ces stress peut donc être à l'origine de l'émission de nombreux signaux qui pourraient expliquer la diversité de réponses associées à la NMS.

II.1. Les plantes voisines sont-elles perçues comme des perturbateurs biotiques ?

En introduction, nous avons vu que les plantes interagissent avec leur environnement en produisant et relâchant un cocktail de molécules chimiques dans le sol et dans l'air. En plus d'avoir un impact sur les microorganismes voisins et la disponibilité des nutriments par exemple, ces composés peuvent influencer la physiologie et le développement des plantes voisines. Ce processus est appelé allélopathie quand il est dirigé contre les autres organismes (Kong *et al.*, 2019). Ce relâchement de composés chimiques dans l'environnement peut donc contribuer aux interactions plante-plante et au phénomène de NMS par différents mécanismes dans les mélanges variétaux (Sharifi & Ryu, 2021).

II.1.1. La NMS est-elle un sous effet de la reconnaissance de son voisinage ?

Globalement, l'effet du relargage par les plantes dans l'environnement de molécules volatiles ou solubles est souvent confondu avec un autre phénomène appelé la reconnaissance du soi ou « kin recognition » (Dudley & File, 2007). Longtemps controversée (Klemens, 2008), la reconnaissance du voisinage végétal est maintenant admise et de plus en plus étudiée chez les plantes (Biedrzycki & Bais, 2010; Dudley *et al.*, 2013; Bais, 2018; Anten & Chen, 2021). Elle ne dépend pas d'ailleurs seulement des composés exsudés mais peut aussi être déclenchée par des mécanismes de compétition pour les ressources souterraines et aériennes ainsi que par les microorganismes associés au voisinage (Pierik *et al.*, 2013; Anten & Chen, 2021; Sharifi & Ryu, 2021).

Au niveau intra-spécifique, la reconnaissance de ses congénères est à l'origine de nombreuses réponses physiologiques décrites à plusieurs reprises dans ce manuscrit (Chapitre 2 et 3). Pour rappel, la reconnaissance intra-spécifique est capable de déclencher une modification de l'allocation de la biomasse, de la floraison et du développement végétatif (Ninkovic, 2003; Dudley et al., 2013; Crepy & Casal, 2015; Delory et al., 2016; Takigahira & Yamawo, 2019; Henry et al., 2020). Signe de cette reconnaissance, la signalisation du danger entre plantes de la même espèce induit des modifications de défense proportionnelles au lien de parenté entre les plantes voisines (Karban *et al.*, 2013; Aljbory & Chen, 2018). Au niveau constitutif, des exemples existent aussi. Comme déjà exposé, l'exposition aux exsudats racinaires des voisins génotypiquement distants induit la synthèse de gènes de défense chez *A. thaliana* (Biedrzycki et al., 2011). Similairement, la reconnaissance d'un voisin intra-spécifique peut réguler la synthèse de composés allélopathiques reliés à la défense chez le tabac (Chen et al., 2019), chez *C. maculosa* (Broz et al., 2010) et comme montré très récemment chez le riz (Xu et al., 2021).

L'ensemble de ces observations montre que la reconnaissance du voisinage intra-spécifique pourrait être un signal permettant le déclenchement de la NMS. Cependant cette hypothèse nécessite que les phénotypes observés soient liés à la distance génétique entre les voisins (Biedrzycki *et al.*, 2011). En effet, Semchenko *et al.* (2014) ont d'ailleurs suggéré que les exsudats pouvaient transporter des informations spécifiques sur la parenté génétique, l'espèce, ou la provenance du voisinage et ainsi déclencher des réponses spécifiques. Or dans nos expériences, aucune corrélation entre les phénotypes associés à la NMS et la distance génétique totale (calculé sur l'ensemble du génome) entre les voisins n'a été détectée. Cependant ces résultats n'excluent pas une reconnaissance à un locus précis et non sur l'ensemble du génome, comme cela a pu être observé dans d'autres études (Montazeaud et al. 2021).

II.1.2. La NMS, un résultat de l'action directe de molécules ?

Dans le cas des interactions plante-plante, l'allélopathie a surtout été étudiée dans les interactions inter-spécifiques, notamment pour le contrôle des adventices (Jabran *et al.*, 2015; Farooq *et al.*, 2020). Les composés allélochimiques peuvent avoir un impact sur la croissance et l'établissement des plantes voisines hétérospécifiques (Meiners *et al.*, 2012). De plus il est aussi bien connu que les plantes peuvent réagir à un stimulus externe et signaler la présence d'un danger à leur voisines par la sécrétion de molécules aériennes ou souterraines, ce qui déclenche des mécanismes de défenses, comme nous l'avons vu dans l'introduction (Introduction, revue) (Karban *et al.*, 2006). Cependant, les composés chimiques des plantes, au pouvoir allélopathique ou non, peuvent aussi avoir des effets au niveau intra-spécifique, ce qui amène à certaines hypothèses sur les mécanismes sous-jacents à la NMS.

Alors que les plantes ont souvent des seuils de tolérance plus élevés que les autres espèces à leurs propres composés allélopathiques (Hickman et al., 2021), leur production est aussi associées à la structuration spatiale des communauté intra-spécifique. En effet il a été montré à de nombreuses reprises que les composés allélopathiques d'une plante peuvent limiter la germination de plantes de la même espèce, un phénomène appelé l'auto-toxicité et qui permet d'optimiser l'occupation de l'espace d'une communauté végétale intra-spécifique (Ervin & Wetzel, 2000; Awty-Carroll *et al.*, 2020). En se basant sur cette observation, le déclenchement de la NMS pourrait être due à la synthèse d'une molécule auto-toxique dans nos expériences de mélanges variétaux. Si un tel mécanisme était à l'œuvre, certains voisins sur-producteurs devraient exister. Certains de nos résultats vont dans ce sens dans le cas de certains génotypes montrant un effet significatif d'IGE (chapitre 1).

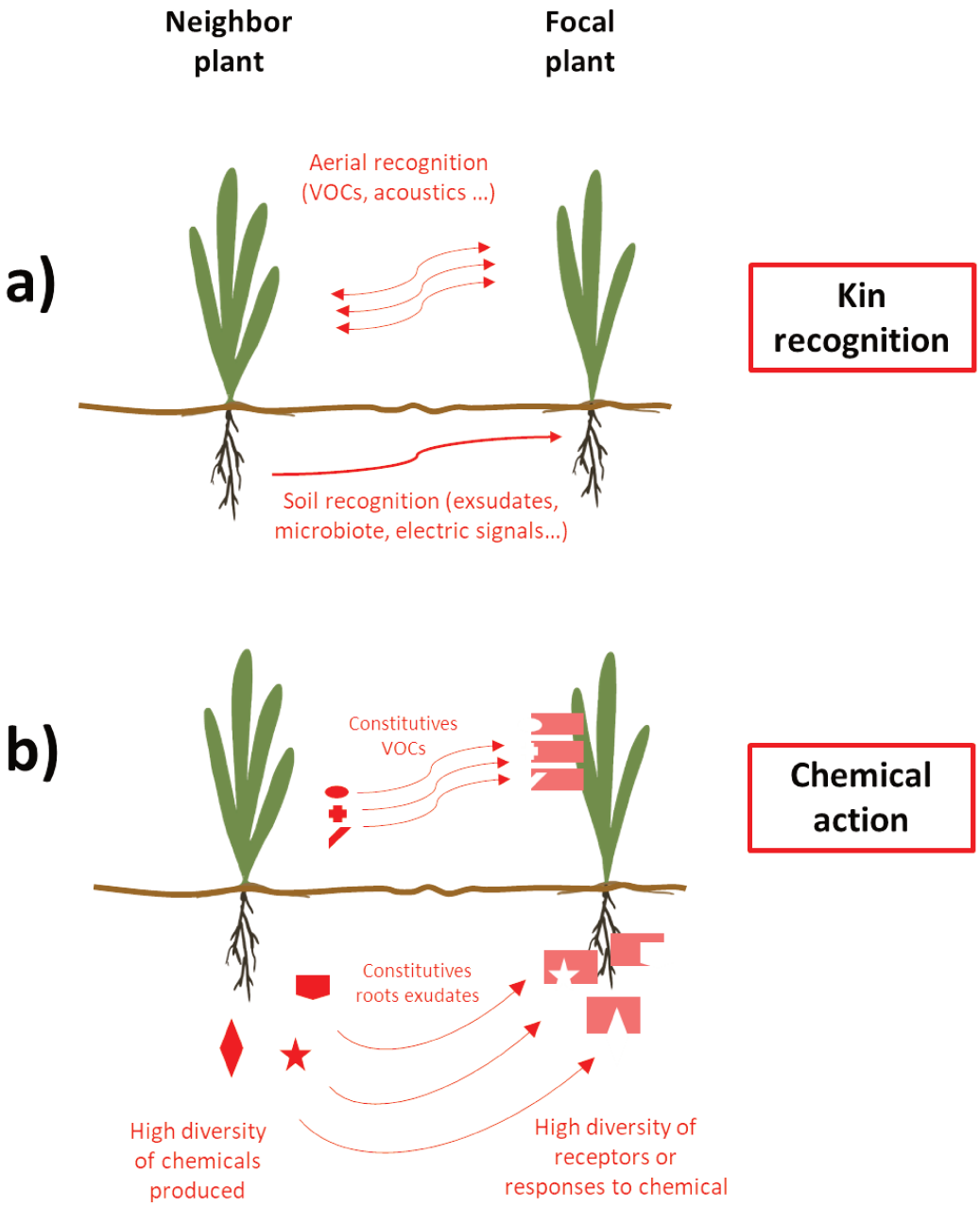


Figure 18. Mécanismes biotiques pouvant être à l'origine de la NMS

Représentation graphique des mécanismes de reconnaissance du voisinage intra-spécifique (a) et de l'action des molécules (b) sur une plante focale. (a) Les mécanismes à l'origine de la reconnaissance du voisinage intra-spécifique peuvent se dérouler dans le sol par l'interaction de molécules contenues dans les exsudats racinaires, par la modification du microbiote par le voisinage, par l'échange d'information par des mycorhizes, des signaux électriques ou acoustiques, le partage des ressources. Dans l'air, la reconnaissance peut intervenir par l'échange de COVs, le toucher, le partage de la lumière, l'échanges de signaux acoustiques. (b) L'action des molécules peut avoir lieu dans l'air (volatiles, COVs) ou dans le sol (volatile ou soluble), la diversité des molécules produites par le voisinage, des récepteurs de la plante focale ou des modes d'actions des molécules chimiques et des réponses induites peuvent expliquer leur effets pléiotropiques.

Une autre hypothèse pourrait reposer sur une variabilité des composés chimiques et allélopathiques et de leurs récepteurs chez les plantes. En effet, des études indiquent que de fortes variabilités de composition des exsudats et du pouvoir allélopathique existent au sein d'une espèce (Moore *et al.*, 2014; Jandová *et al.*, 2015). De plus, alors que certains composés sont spécifiques d'un récepteur, d'autres peuvent être non spécifiques et avoir un effet sur un grand nombre de récepteurs (Moore *et al.*, 2014). De plus, les récepteurs des plantes sont souvent polymorphiques (Kahlon & Stam, 2021). Or, certains moyens de communication intra-spécifiques sur un modèle ligand/récepteur ont été mis en évidence. Par exemple la systémine, un petit peptide participant à la communication entre les cellules d'une plante et avec les plantes voisines intra-spécifiques, a été mis en évidence chez la tomate (Coppola et al., 2017). Pour agir sur les plantes voisines, ce peptide nécessite de transiter dans le sol et de se fixer sur son récepteur dans la plante voisine (Matsubayashi et al., 2001; Coppola et al., 2017).

Dans l'hypothèse où le déclenchement de la NMS dans les mélanges variétaux de riz et de blé serait basé sur un mécanisme de ligands/récepteurs diversifiés (**Figure.18**), la multitude de variations intra-spécifiques de la production et de l'exsudation de molécules ainsi que de leurs récepteurs pourraient expliquer la diversité des phénotypes de NMS rencontrée dans nos expériences.

II.1.2.1. Quelles molécules pour déclencher la NMS chez le riz et le blé ?

Nos résultats chez le blé et le riz montrent que le phénomène de NMS nécessite une interaction dans le sol. Cela suggère que le déclenchement de la NMS pourrait être associé à une communication chimique entre les deux génotypes et relié à la synthèse d'exsudats racinaires. Plusieurs molécules peuvent donc être impliquées dans la NMS dans nos modèles d'étude et ont retenu notre attention.

II.1.2.1.1. Molécules susceptible de déclencher la NMS chez le riz

Chez le riz, de nombreuses différences ont été observées dans la composition et la quantité de molécules sécrétées par les racines en fonction des cultivars (Seal et al., 2004). L'analyse des exsudats de différents cultivars a permis leur classification en fonction de leurs capacités allélopathiques, en l'occurrence leur capacité à inhiber la croissance des plantes (Olofsdotter, 2001; Kato-Noguchi *et al.*, 2002; Amb & Ahluwalia, 2016; Yang & Kong, 2017). Certains de ces exsudats racinaires sont des candidats possibles pour les interactions plantes-plantes intra-spécifiques chez le riz.

La capacité du riz à reconnaitre et à différencier d'autres génotypes de riz a été lié à la synthèse d'un de ses exsudats racinaires, l'allantoïne (Yang et al., 2018). De plus, les phénotypes associés à cette reconnaissance semblent plus marqués lorsque la distance génétique entre les deux cultivars de riz augmente (Fang et al., 2013; Yang et al., 2018). L'allantoïne est un composé de la famille des Uréides, faisant partie du cycle de l'azote chez les légumineuses et les poacées (Lee et al., 2018). Il a été montré que sa production et son excrétion dans le sol pouvait varier en fonction du cultivars de riz, mais aussi en fonction du voisinage (Wang et al., 2007; Xu et al., 2021). De plus son application exogène au niveau racinaire peut induire l'expression de gènes de défense chez *A. thaliana* (Irani & Todd, 2018) en plus d'éliciter la production de molécules de défense par le riz (Xu et al., 2021). Ces résultats font donc de l'allantoine un molécule candidate dans le déclenchement de la NMS chez le riz.

D'autres molécules peuvent aussi présenter un intérêt dans l'étude de la réponse du riz à son voisinage, comme les momilactones ou le loliolide. Les momilactones sont des mono-terpènes (Schmelz et al., 2014) dont la production peut être déclenchée chez le riz par son voisinage (Kato-Noguchi, 2011) et qui ont montré un effet allélopathique sur d'autres espèces (Kato-Noguchi & Peters, 2013; Kato-Noguchi et al., 2014). Récemment les momilactones ont été impliquées dans la reconnaissance du voisinage intra-spécifique, car induits en présence de voisins génétiquement distants chez le riz (Serra Serra et al., 2021). De façon similaire, le lolilolide a été montré comme participant au pouvoir allélopathique du riz (Li et al., 2020) et pourrait présenter un candidat pour des études ultérieures.

II.1.2.1.2. Molécules susceptibles de déclencher la NMS chez le blé

L'aptitude du blé à reconnaitre ses congénères intra-spécifiques et à induire des réponses spécifiques a été démontré (Henry *et al.*, 2020; Anten & Chen, 2021). Cependant, comme pour le riz, les mécanismes et molécules impliqués restent encore peu explorés.

Récemment, la réponse allélopathique du blé à différentes espèces et d'autres génotypes de blé a été analysée. Les résultats ont montré que la réponse associée à la détection du voisin chez le blé (production de DIMBOA dans les racines de blé) pouvait être associée à la présence de loliolide et d'acide jasmonique dans les exsudats racinaires de la plante voisine (Kong et al., 2018). La réponse allélopathique du blé (production de DIMBOA) est par ailleurs intéressante car le DIMBOA, un métabolite secondaire de la famille des benzoxazinoïdes produit par la majorité des Poacées, peut lui aussi être à l'origine de modifications dans les plantes voisines (Venturelli *et al.*, 2015; Niculaes *et al.*, 2018). En plus d'être à l'origine de l'activation de gènes

de défense chez le maïs (Ding et al., 2015), il a été montré qu'il peut induire l'expression des défenses chez *A. thaliana* en agissant sur l'expression et la conformation des histones desacetylases (Venturelli et al., 2015). Ce mode d'action d'une molécule qui agit sur la régulation de la chromatine des plantes voisines a déjà été détecté chez le soja soumis aux volatiles de la menthe (Sukegawa et al., 2018). Un tel mode d'action des molécules dans les mélanges variétaux pourrait expliquer les nombreuses modifications associées au voisinage, et notamment les profils transcriptomiques en réponse au voisinage intra-spécifique observés chez Kitaake (Chapitre 3).

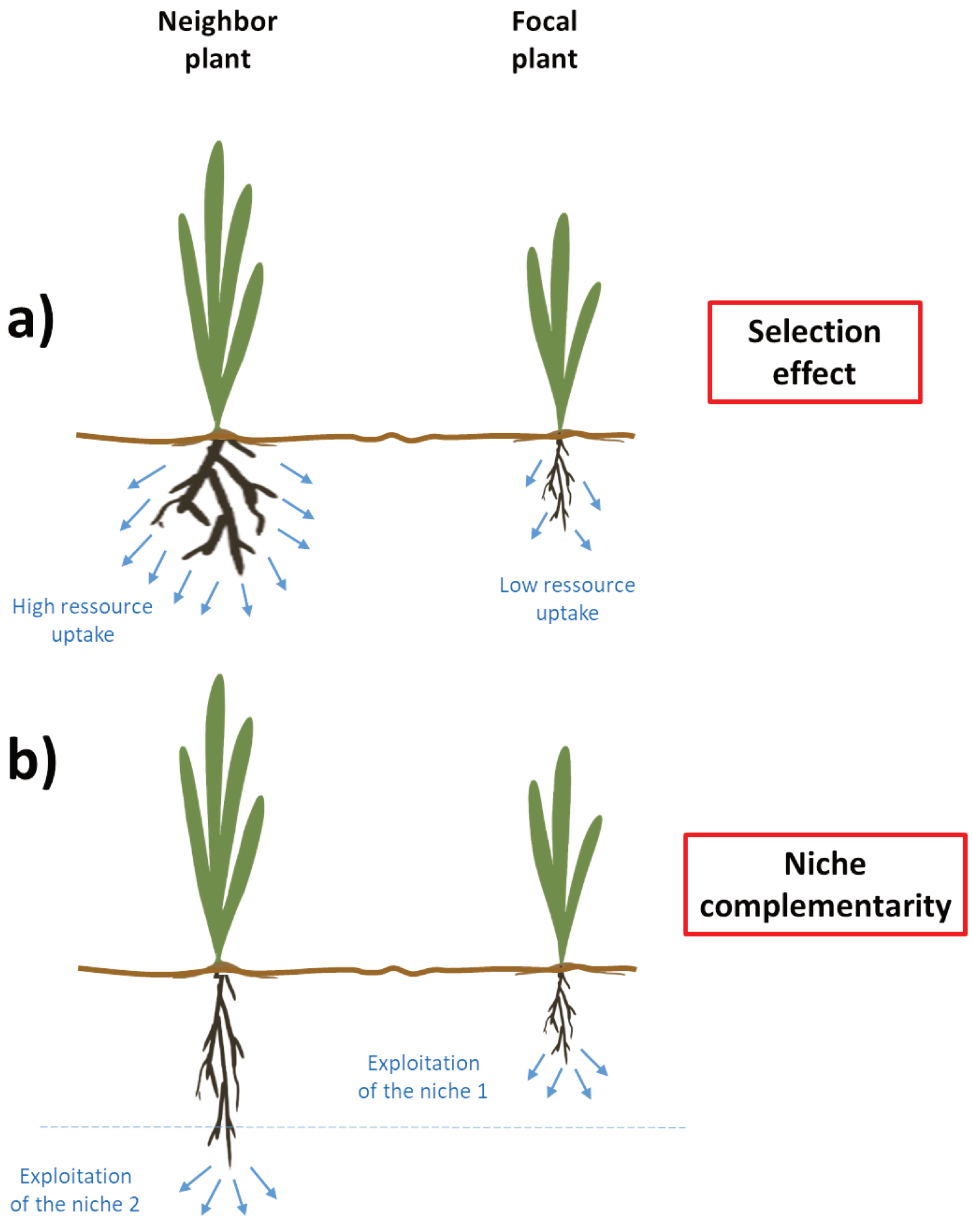


Figure 19. Mécanismes abiotiques possiblement à l'origine de la NMS

Mécanismes abiotiques pouvant être responsables d'une absorption des nutriments différents dans les mélanges variétaux. (a) L'effet de sélection décrit la différence d'aptitude à la compétition d'un génotype par rapport à un autre. Ici le génotype voisin a des capacités d'absorption plus importantes que le génotype voisin et va s'approprier plus de ressources que le génotype focal. (b) la complémentarité de niche désigne l'exploitation de deux parties et/ou de deux ressources du sol (ou de l'espace aérien pour la lumière par exemple) différente entre les deux génotypes du mélange et peut amener à maximiser l'absorption des nutriments.

II.2. Les plantes voisines sont-elles perçues comme perturbateurs abiotiques ?

En évoluant dans leur milieu, les plantes consomment les ressources souterraines et aériennes et modifient donc le milieu abiotique proche. Puisque l'environnement abiotique peut être à l'origine de modifications de l'immunité des plantes et de leur sensibilité (Arbona et al., 2017; Saijo & Loo, 2020), l'impact du génotype voisin peut donc contribuer au déclenchement de la NMS dans les mélanges variétaux (**Figure.19**).

II.2.1. La NMS est-elle déclenchée par une différence d'aptitude à la compétition?

Lorsque deux génotypes occupent le même espace, ils rentrent en compétition pour les ressources. Les théories écologiques prévoient d'ailleurs souvent un « gagnant » qui grâce à de meilleurs traits compétitifs, domine l'accès à certaines ressources sur un « perdant » (Tilman, 1982).

Au niveau aérien, la compétition pour la lumière est un bon exemple de ce phénomène. En effet, des génotypes grands peuvent capturer plus de lumière incidente que des génotypes petits et générer des mécanismes d'évitement de l'ombre (Violle et al., 2009; Crepy & Casal, 2015). Ce type de compétition est un phénomène bien connu pour déclencher une modification de la sensibilité des plantes, comme décrit en introduction (Cerrudo et al., 2012; Ballaré, 2014). Ce mécanisme qui pourrait être à l'origine de nos phénotypes de NMS observés semble cependant peu probable dans nos conditions expérimentales. Nos expériences prennent place à un stade très jeune des plantes, elles sont placées dans un environnement sur-éclairé par une forte luminosité artificielle homogène. De ce fait leur capacité à générer de l'ombre sur les génotypes voisins reste mince.

Cependant dans le compartiment souterrain, les différences d'aptitudes à la compétition, notamment reliés aux diversités des traits racinaires entre génotypes pourraient générer un partage des ressources inégales dans un mélange (Loreau & Hector, 2001). Nos systèmes expérimentaux tentent de minimiser ce phénomène en apportant une fertilisation en excès pour limiter la compétition pour les nutriments. Cependant, un tel phénomène pourrait être à l'œuvre dans nos systèmes expérimentaux pour certains éléments qui ne sont pas disponibles en excès, comme l'eau par exemple. L'apport hydrique étant un facteur abiotique essentiel pouvant moduler les mécanismes de sensibilité aux agents pathogènes (Bidzinski et al., 2016; Saijo & Loo, 2020), une compétition intra-spécifique pour l'eau pourrait expliquer le déclenchement de la NMS dans nos expériences. Cependant, dans un tel cas, il parait peu probable que les mesures écophysiologiques réalisées dans le chapitre 2 ne détectent pas ce différentiel d'absorption.

II.2.2. La NMS est-elle dépendante de l'exploitation de différentes niches écologiques?

La conception de mélanges variétaux repose souvent sur l'idée qu'associer des génotypes avec des caractéristiques phénotypiques différentes va permettre une meilleure utilisation des ressources (Litrico & Violle, 2015; Barot et al., 2017). Cette idée repose sur deux concepts majeurs, la facilitation et la complémentarité de niche. La facilitation d'un côté désigne l'impact d'une plante voisine qui peut faciliter l'accès aux ressources d'une autre plante (Callaway et al., 2002). De l'autre côté, l'hypothèse de la complémentarité de niche propose que dans un système diversifié, l'acquisition des ressources est favorisée par l'utilisation de différentes niches écologiques et, est supérieur aux monocultures (Li *et al.*, 2007b; File Amanda L. *et al.*, 2012). Ces deux théories ont été démontrées dans le cas de systèmes diversifiés de plusieurs espèces : par exemple il a été démontré que le millet peut bénéficier du pois d'Angole pour améliorer son absorption de nutriments tels que l'eau ou l'azote (Saharan et al., 2018). Leur implication dans les mélanges variétaux peut être imaginée, notamment dans les mélanges de génotypes avec des traits reliés à l'acquisition des nutriments variables (Litrico & Violle, 2015).

La présence de voisins intra-spécifiques pourrait modifier l'acquisition des ressources des génotypes en mélanges par rapport à leur culture pure par différents mécanismes (facilitation ou complémentarité de niche ; Loreau & Hector, 2001) dans nos systèmes expérimentaux. Cette possibilité est cohérente avec les modifications des concentrations d'acides aminés observées dans les feuilles de riz en mélange (Chapitre 2). Comme la nutrition est primordiale pour la santé des plantes (Dordas, 2008), tantôt positif (niveau de défense corrélé à la concentration de glutamate dans les feuilles par exemple (Kadotani et al., 2016)), tantôt négatif (taux de glutamine dans les feuilles augmente l'agressivité des attaques de pathogène (Huang et al., 2017)), des effets indirects des interactions plantes-plantes sur la sensibilité des plantes aux agents pathogènes pourrait donc être expliqués par des changements dans la nutrition du fait d'une compétition différentielle.

Par ailleurs, alors que notre réflexion considère souvent la compétition dans le sol uniquement du point de vue de la nutrition, d'autres facteurs pourraient intervenir. Par exemple, il a été montré récemment que l'espace physique présent dans le substrat (ici la taille du pot) pouvait influencer la physiologie de plantule de blé en conditions contrôlées (Wheeldon et al., 2021). Un phénomène qui pourrait avoir des implications dans nos systèmes expérimentaux en pot où deux génotypes doivent se partager l'espace présent. En effet, le mélange de deux génotypes aux capacités d'installation, de développement et de biovolume racinaire différents pourrait les amener à modifier leur physiologie et peut-être leur sensibilité.

II.3. Perspectives de recherches

L'ensemble de nos expériences a permis de préciser les mécanismes déclencheurs de la NMS ainsi que les réponses associées dans les plantes focales. L'analyse de ces résultats ouvre aussi des perspectives de recherches (**Figure.6**)

II.3.1. Recherche des mécanismes déclencheurs de la NMS

II.3.1.1. Caractériser l'ensemble des déclencheurs de la NMS

L'analyse des résultats montrent que la communication chimique pourrait être à l'origine des réactions de NMS dans nos systèmes expérimentaux. L'impact des molécules sur la sensibilité des plantes pourrait être relié à une action directe ou être à l'origine d'un mécanisme de reconnaissance entre apparentés. L'étude de la bibliographie montre que de nombreuses molécules sont candidates pour participer au déclenchement de la NMS chez le riz et le blé. En conséquence, une caractérisation des différentes molécules et de leur concentration dans les exsudats racinaires des génotypes en mélanges est primordiale pour de futures recherches. La séparation des exsudats provenant de différents génotypes d'un même mélange représentant encore un défi à l'heure actuelle, une application exogène d'exsudats racinaires extraits d'un génotype en culture pure sur les racines d'un autre génotype pourrait constituer une bonne première approche, comme utilisé précédemment chez *A. thaliana* (Biedrzycki et al., 2011). Sous l'hypothèse que les molécules recherchées sont produites dans la culture pure, cette expérience pourrait permettre à terme de séparer et d'identifier un ou plusieurs composés chimiques responsable du déclenchement de la NMS.

Dans nos expériences, la proximité de plusieurs pots de mélanges différents, dans un espace restreint clos (chambre de culture, serres) rend peu probable l'implication des volatiles dans le déclenchement de la NMS. Par ailleurs nos résultats montrent qu'une interaction au niveau racinaire est nécessaire au déclenchement de la NMS, mais ils n'excluent pas un double système (reconnaissance au niveau racinaire puis déclenchement par des molécules volatiles). Par ailleurs de nombreux résultats indiquent que les COVs peuvent être à l'origine de la détection du voisinage chez les plantes et notamment chez les céréales (Ameye et al., 2015; Ninkovic et al., 2019, 2020). De futures expériences devront donc tester l'implication des volatiles dans le déclenchement de la NMS dans des dispositifs adaptés, avec l'utilisation de cloches en verres hermétiques permettant de séparer la communication aérienne ou d'exposer un génotype au volatile d'un autre (Ninkovic, 2003).

Nos résultats obtenus dans un sol autoclavé semblent montrer que le microbiote du sol n'est pas impliqué dans la NMS. Nos dispositifs expérimentaux ne nous ont cependant pas permis de nous affranchir du microbiote endogène des graines, ainsi que du microbiote apparu lors des 3 semaines de croissance. Etant donné que le microbiote peut participer à un mécanisme appelé le PSF (Plant Soil Feedback, Voir Introduction) dans les mélanges variétaux (Hu et al., 2018; Rolfe et al., 2019), ainsi qu'à la communication entre les génotypes du mélange (échange d'informations par les mycorhizes par exemple) (Sharifi & Ryu, 2021), le microbiote du sol devra aussi être considéré pour les futures recherches sur la NMS. Des expériences de cultures *in vitro* pourraient notamment permettre de s'affranchir totalement du microbiote.

Notre approche expérimentale a par ailleurs tenté de minimiser l'impact des ressources en les apportant en excès. L'analyse de la bibliographie montre cependant qu'elles peuvent jouer un rôle dans la sensibilité des plantes et donc être potentiellement impliquées dans le déclenchement de la NMS (Dordas, 2008). A l'avenir, tester la robustesse des phénotypes associés à la NMS en réduisant l'apport de certains éléments choisis au préalable pourrait permettre d'identifier certaines ressources pouvant jouer un rôle dans le déclenchement de la NMS.

D'autres pistes mériteraient aussi d'être exploitées au regard de nos résultats. Par exemple, nos expériences présentées dans le chapitre 2 révèlent que le contact racinaire est nécessaire aux réactions de NMS chez le blé mais pas chez le riz. Le contact physique, aérien notamment, entre les plantes voisines a déjà été évoqué récemment comme participant aux modifications de sensibilité liée aux interactions plante-plante chez le maïs (Markovic et al., 2019). Des expériences de séparation de compartiment aérien par une barrière physique pourraient permettre de tester l'implication de contact entre les parties aériennes dans nos résultats. Plus récemment encore, des recherches présentent les signaux électriques et acoustiques comme des potentiels moyens de communication entre les plantes (Volkov et al., 2019), ce qui montre que de nombreux signaux restent encore à tester pour identifier les interactions biotiques associées à la NMS.

II.3.1.2. Evaluer l'importance du facteur génétique dans le déclenchement de la NMS

Nos expériences ont permis d'identifier le locus *NMS1* associé au déclenchement, par un voisin présentant l'haplotype *NMS1-3*, de la NMS dans le génotype Kitaake. Plusieurs pistes, décrites dans le chapitre 3, devront être explorées et notamment le rôle possible de l'acquisition du phosphore dans le déclenchement de la NMS.

Il serait aussi intéressant de tester si d'autres génotypes que Kitaake montrent une NMS modifiée en réponse à l'haplotype *NMS1-3*. Ces expériences permettraient de déterminer si le déclenchement de la NMS par cet haplotype est spécifique ou générique. Dans le cas où son effet se révèlerait générique, une caractérisation fonctionnelle de ce locus pourrait être envisagée par des approches de biologie fonctionnelle (mutants…).

II.3.2. Recherche des réponses associées à la NMS

A travers nos expériences, nous montrons que les réponses des plantes focales au voisinage intra-spécifique peuvent être complexes et diverses : sensibilité aux agents pathogènes, écophysiologique (biomasse aérienne), métaboliques (concentration en acide aminés) et transcriptomiques. Cette diversité de réponses n'est probablement pas exhaustive et mérite d'être plus explorée.

II.3.2.1. Evaluer l'ensemble des réponses associés à la NMS dans la plante focale

Puisque nous observions notre phénotype pathologique sur les feuilles, notre étude des réponses s'est focalisée sur les parties aériennes des plantes. Or, nos résultats montrent qu'une interaction dans le compartiment racinaire est nécessaire pour induire les modifications de sensibilité associées à la NMS. L'analyse de la bibliographie montre que l'effet du voisinage provoque des réponses physiologiques et morphologiques dans le compartiment racinaire (Fang et al., 2013; Yang et al., 2018; Zhu et al., 2019). Pour compléter les résultats présentés ici, une étude approfondie des réponses et des réponses morphologiques, physiologiques et moléculaires des racines des plantes focales dans nos systèmes expérimentaux sera donc nécessaire.

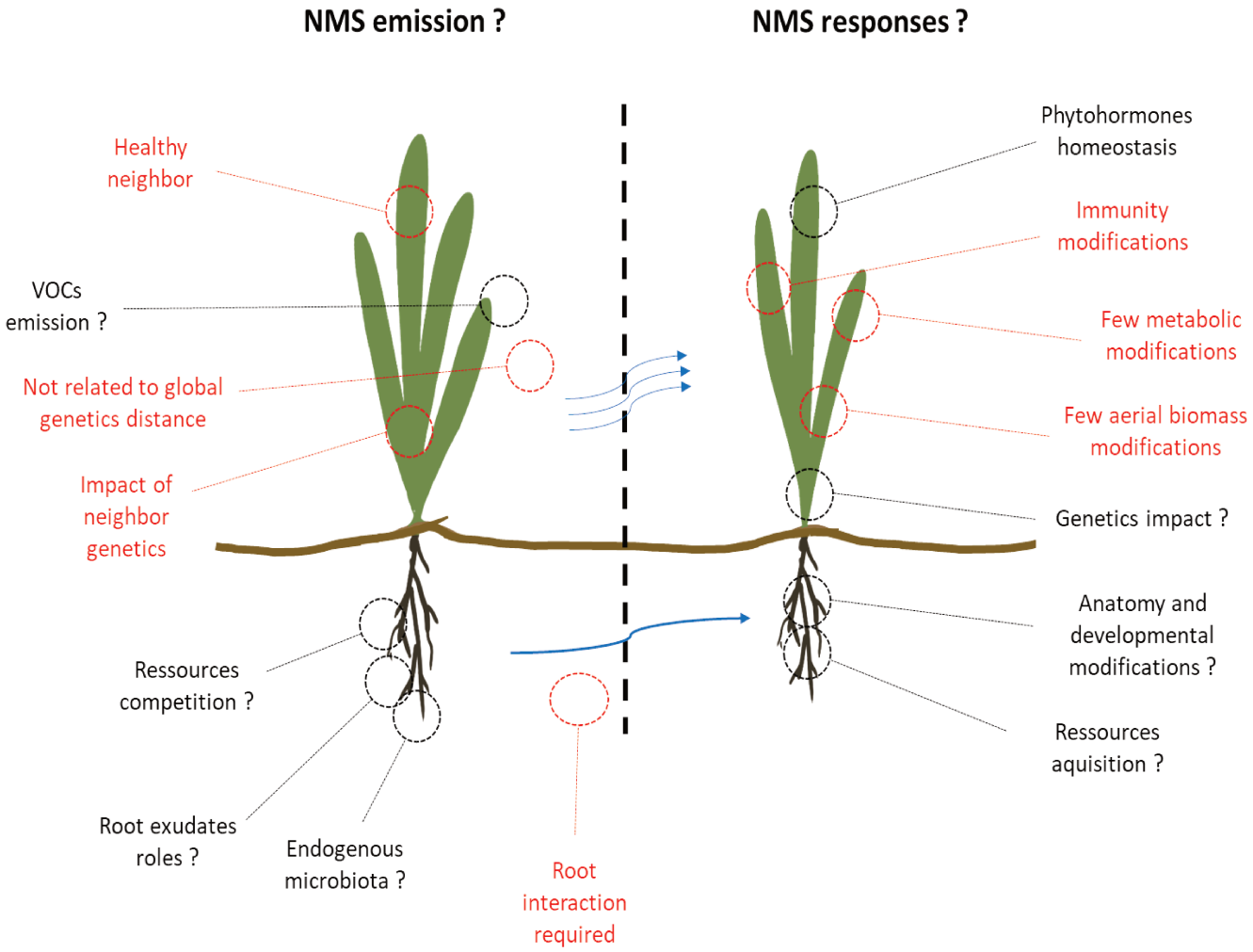


Figure 20. Déclenchement et réponses associées à la NMS : questions restantes

Synthèse des résultats présentés dans ce manuscrit (en rouge) apportant des indications sur le déclenchement et les réponses associées à la NMS et questions restantes au regard de la bibliographie et des hypothèses (en noir) discutées dans ce manuscrit.

II.3.2.2. Des mesures physiologiques complémentaires nécessaires

Comme nous l'avons vu au cours de ce manuscrit, les différences de réponses NMS aux agents pathogènes présentant des modes de vie différents pourrait être en partie expliquée par une modification de la quantité et la localisation des phytohormones dans la plantes. Nos analyses moléculaires du chapitre 3 indiquent par ailleurs que l'expression de certains gènes marqueurs répondant à des phytohormones est modifiée dans certains cas de NMS. En conséquence une analyse plus fine des régulations hormonales dans les plantes focales est nécessaire, à commencer par des dosages d'hormones en réponse au voisinage.

Les réponses variées de la NMS peuvent aussi être expliquées par des aptitudes différentes des plantes focales à la compétition par rapport à leur plantes voisines. Afin d'explorer cette hypothèse, il est primordial pour de futures expériences de mesurer les mécanismes de compétition et leur relation avec les phénotypes de NMS. Des mesures d'absorption des nutriments, de gestions de leurs ressources, ou des tests de nos phénotypes les plus marqués dans des conditions d'apport de certains nutriments limitants pourraient dans un premier temps apporter des éléments de compréhension.

II.3.2.3. Etudier la diversité des réponses NMS

L'étude des mécanismes génétiques et transcriptomiques de la NMS a été centrée sur la variété Kitaake qui représente un modèle de génomique du riz (Li et al., 2017). Cependant l'analyse des matrices révèle que Kitaake présente souvent un comportement opposé à celui qui est observé dans les japonica tempérés. Par exemple Kitaake présente un niveau de sensibilité réduit à M. oryzae dans la plupart des associations, alors que la grande majorité des génotypes de riz japonica tempérée voient leur sensibilité augmentée par la culture en mélange (Chapitre 1). Ces observations montrent donc que Kitaake n'était peut-être pas le meilleur génotype pour tirer des conclusions générales sur les phénomènes de NMS chez la population des riz japonica tempérés. Dans tous les cas, afin de mieux cerner les réponses associées à la NMS, il sera primordial dans le future d'examiner les réponses de NMS dans plusieurs fonds génétiques différents pour mieux les appréhender. Par la suite, une analyse des déterminants génétiques de la mise en place de la NMS dans la plante focale (par GWAS) pourrait permettre de mieux comprendre les régulations en jeu (**Figure.20**).

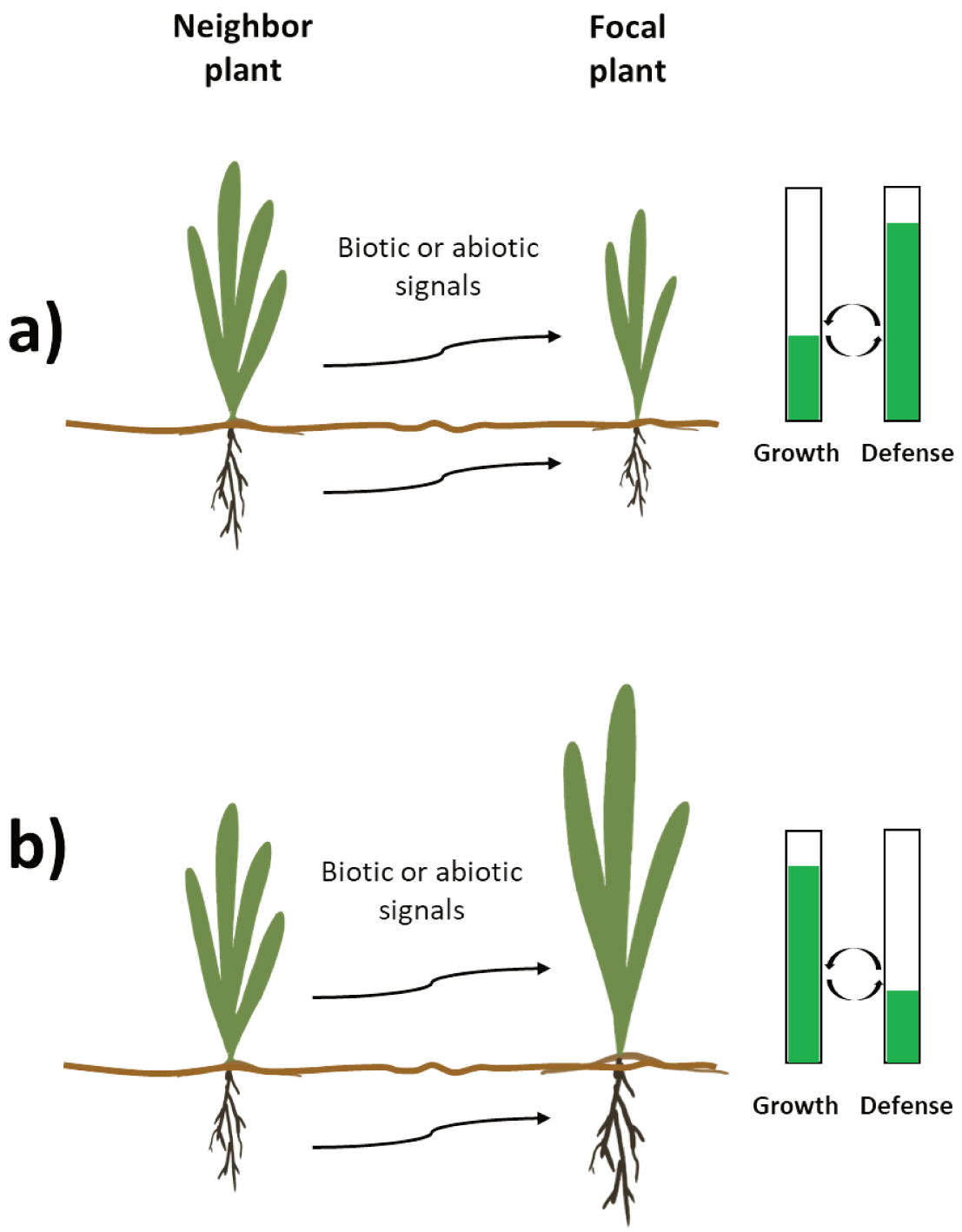


Figure 21. Hypothèse du compromis entre croissance et défense

Le « trade-off » (compromis) entre croissance et défense désigne une modification de la défense par le biais d'une modification de l'investissement métabolique dans la croissance ou l'inverse. Dans les mélanges variétaux, une plante voisine peut modifier l'assimilation des ressources ou entrainer un stress biotique qui peuvent impacter l'investissement dans la croissance (augmenter ou diminuer). La défense peut être impactée par le biais de ce compromis métabolique.

III. Comment expliquer que les plantes modifient la sensibilité de leurs voisines?

L'ensemble de nos observations montre que le voisinage intra-spécifique, en dépit des comportements particuliers de certaines focales, génère une modification moyenne significative de la sensibilité au niveau de la population. En plus des potentiels mécanismes impliqués, ces résultats interrogent sur les causes écologiques et évolutives d'un tel phénomène.

III.1. La NMS traduit-elle des capacités différentes des génotypes à gérer les stress de leur environnement ?

La diversité des réponses NMS identifiées au sein des populations de riz et de blé pourrait être expliquée par les différentes stratégies des génotypes qui les composent. En effet, chez les plantes, il existe une variation intra-spécifique de réponse aux différents stress (Gaudet *et al.*, 2011; Matesanz & Ramírez-Valiente, 2019). Nous avons vu dans le paragraphe précèdent que le voisin végétal peut être perçu comme un stress abiotique, biotique et surtout comme leur combinaison. Il est possible d'imaginer que la combinaison de ces stress génère des profils de réponses spécifiques aux stratégies de chacun des génotypes, ce qui expliquerait en partie la diversité des réponses NMS au sein d'une population donnée.

En parallèle, les plantes doivent équilibrer la répartition de leurs ressources entre les mécanismes de croissance, de survie et de reproduction pour maximiser leur aptitude dans leur environnement (Ge et al., 2019). De ce fait, les modifications de croissance due à la compétition intra-spécifique peuvent donc intervenir en sollicitant des processus aux dépens d'autres (Karasov *et al.*, 2017). Par exemple, une augmentation de la croissance en réponse à la compétition peut diminuer l'allocation des ressources dans la défense notamment en sollicitant les voies des phytohormones bien connues pour avoir de nombreux rôles dans la défense et la croissance des plantes (Huot et al., 2014). A l'inverse, lorsqu'une plante est attaquée par un agent pathogène, l'activation des défenses s'accompagnerait d'une réduction de croissance et de reproduction (Karasov et al., 2017). L'existence d'un compromis (ou « trade-off » en anglais) entre croissance et défense chez les plantes a d'ailleurs été démontrée (Huot et al., 2014; Campos et al., 2016; Karasov et al., 2017). Par exemple, dans une expérience de mélanges d'espèces d'arbres, la compétition entraine une réduction de la biomasse aérienne et une augmentation des défenses (Donaldson et al., 2006; Fernandez et al., 2016). Même si cette notion de « trade-off » entre croissance et défense est controversée (Kliebenstein, 2016), elle

pourrait expliquer comment un voisin intra-spécifique influence la sensibilité d'une plante focale dans nos expériences (**Figure.21**).

Néanmoins, même si nos mesures de réponses écophysiologiques ont montré un impact du voisinage végétal sur la biomasse aérienne de Kitaake (chapitre 3), les modifications de croissance observées restent faibles, ce qui suggère que ce compromis, s'il existe, pourrait intervenir à d'autres niveaux que la biomasse aérienne (chapitre 2). Une étude approfondie des réponses physiologiques de chaque génotype au mélange, dont la biomasse racinaire mais aussi l'investissement futur dans la reproduction, semble nécessaire pour préciser leur rôle dans le déclenchement de la NMS dans nos expériences.

III.2. La NMS une adaptation sociale des plantes à leurs voisines ?

Notre étude peut suggérer que nous avons potentiellement découvert un comportement social chez les plantes dans lequel une communauté d'individus génétiquement proches gère collectivement son immunité. Ce type de phénomène, appelé immunité sociale, est bien connu chez les insectes (Frank, 2007; Cremer et al., 2018; Cremer, 2019). Plus généralement, les comportement sociaux ont été identifiés dans la plupart des branches phylogénétiques, notamment chez les bactéries (Rendueles et al., 2015; Lyons et al., 2016), les amibes (Mehdiabadi et al., 2006), et chez les animaux (Ratnieks, 2015; Cremer, 2019). Dans le monde végétal, de récents exemples suggèrent que les plantes pourraient être considérées comme des organismes sociaux (Baluška & Mancuso, 2009; Karban et al., 2013; Torices et al., 2018) mais ils restent encore peu nombreux (Bilas et al., 2021).

L'existence de comportements sociaux se base sur une théorie énoncée en 1964 par un biologiste anglais Hamilton (Hamilton, 1964a,b) et reprise plus récemment (West et al., 2007) : la sélection de parentèle (ou « kin selection »). Cette théorie prévoit que les organismes vivants ont un intérêt évolutif à favoriser le développement et la reproduction de leurs voisins apparentés afin d'assurer la transmission du patrimoine génétique commun. Cette théorie est en contradiction avec la théorie originelle de l'évolution de Darwin qui prévoit que les individus évoluent de manière égoïste afin de maximiser la transmission de leurs propres gènes (Darwin & Wallace, 1958). La théorie de la sélection de parentèle explique particulièrement la division en castes et les phénomènes de stérilité rencontrés chez certaines espèces d'insectes par exemple (Hall & Goodisman, 2012). Elle peut aussi être utilisée pour expliquer les avantages évolutifs des comportements sociaux (West et al., 2007). Ainsi des interactions liées à la parenté

génétique ou liées au partage d'un gène social qui peuvent être utilisées pour expliquer certains de nos résultats.

III.2.1. Une régulation de l'immunité individuelle en fonction de la communauté

Dans les populations naturelles de plantes, certains traits sont sélectionnés au niveau de la population à travers le temps et non juste au niveau de l'individu, comme la taille des plantes par exemple (Anten & Vermeulen, 2016). Concernant la défense individuelle des plantes, la théorie des jeux qui analyse l'évolution des coûts et des bénéfices de chaque trait dans une population, permet de montrer que selon les coûts de la défense et la probabilité d'une attaque, un individu dans une population bien défendue aurait intérêt à réduire son niveau de défense, car il éviterait les coûts associés à la défense (Augner et al., 1991). Un investissement dans la défense réduit pourrait donc être sélectionné et ainsi favoriser l'assimilation des ressources ou la reproduction par exemple. Cependant, cette modification de défense n'est possible que si la fréquence des attaques est faible, sinon cela pourrait conduire à une performance moindre de chaque individu et donc de la population. Ces éléments nous amènent donc à proposer qu'il est possible que la NMS reflète une forme d'adaptation des populations à leur milieu diversifié. En effet dans un système intra-spécifique diversifié, où les attaques d'agents pathogènes sont limitées par les processus épidémiologiques comme les effets de barrière ou de dilution (Mundt, 2014), une réduction de l'investissement dans la défense individuelle peut donc être envisagée car il représente un intérêt évolutif. Cette hypothèse pourrait donc nous permettre d'expliquer pourquoi la majorité des interactions testées entre plantes de génotypes différents conduisent à une augmentation de la sensibilité individuelle (**Figure.22a**) dans le cas des attaques par *M. oryzae*, *B. oryzae* et *Z. tritici*. Elle n'explique pas en revanche l'observation inverse que les interactions blé-blé augmentent la résistance individuelle à la rouille brune.

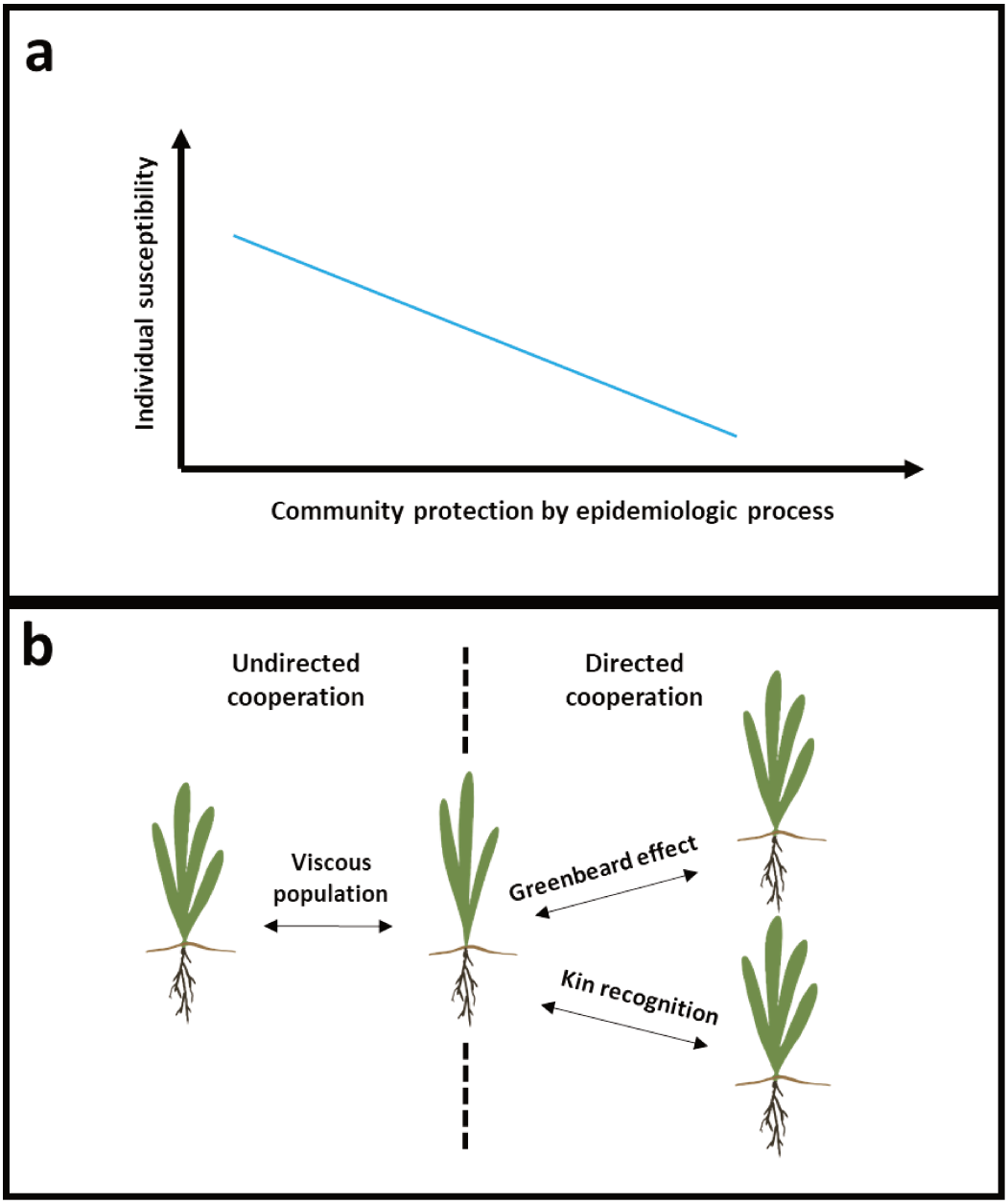


Figure 22. Théories sociales pouvant expliquer l'apparition de la NMS

Représentation des théories pouvant expliquer les comportements sociaux décrits dans ce manuscrit.
(a) L'augmentation de la diversité dans une parcelle peut diminuer l'impact des attaques d'agents pathogène grâce à des processus épidémiologiques (barrière, dilution). Cette diminution de probabilité d'être soumis à une attaque de l'agent pathogène peut entrainer un intérêt évolutif à ce que les génotypes de la communauté diminuent leurs défenses individuelles et augmentent donc leur sensibilité.

(b) Dans les mélanges intra-spécifiques, l'apparition de la NMS peut être expliquée par des mécanismes de coopération non dirigée chez les populations dites visqueuses qui maximisent leur proximité avec leurs apparentés par un faible taux de dispersion. A l'inverse, une coopération dirigée peut être produite par un mécanisme de reconnaissance de l'apparentement (Kin recognition) ou par un locus/gène précis (Greenbeard effect).

III.2.2. L'impact de la sélection de parentèle dans les populations visqueuses

Les espèces visqueuses désignent les espèces de plante où la dispersion des graines et du pollen, et donc des descendants, est restreinte (van Baalen & Rand, 1998). Les espèces visqueuses sont donc plus enclines à avoir un apparentement élevé avec leurs voisins proches (Queller, 1994). Ce phénomène peut amener à un développement de comportements sociaux tels que de la coopération « aveugle » qui est dirigée vers n'importe quel voisin, indépendamment de son apparentement. L'apparition de mécanismes de coopération est donc favorisée chez les populations visqueuses au contraire des autres populations de plantes à fort taux de dispersion (Platt & Bever, 2009). Dans nos expériences, l'utilisation de céréales qui sont typiquement des espèces à faible taux de dispersion peut expliquer les phénotypes de NMS observés, notamment chez le blé où la majorité des interactions diminue la sensibilité à la rouille.

III.2.3. Les mécanismes de reconnaissance et leur impact sur les phénomènes de NMS

La coopération peut aussi être dirigée de façon active en fonction de l'apparentement (**Figure.22b**) selon un mécanisme de « kin recognition » décrit précédemment. La reconnaissance peut aussi être liée à un effet de barbe verte (« greenbeard effect ») qui repose sur l'existence de locus de reconnaissance (Gardner, 2019b). Alors que la « kin recognition » repose sur la parenté génétique globale entre les partenaires sociaux, l'effet de barbe verte se base seulement sur l'apparentement à un locus. Il est peu probable que la « kin recognition » génère les phénotypes de NMS dans nos expériences puisque nous avons montré que la distance génétique totale n'avait pas d'influence sur le phénotype de NMS. Par contre le mécanisme de barbe verte peut tout à fait être à l'origine des phénotypes de NMS et pourrait ainsi permettre d'expliquer les différences de réactions d'une focale en fonction des génotypes voisins (s'ils possèdent le locus de reconnaissance ou non). Dans ce contexte, le locus *NMS1* identifié ne peut cependant pas constituer un locus de reconnaissance sociale qui aurait pour effet (coopération) la réduction de sensibilité dans la plante focale Kitaake. En effet, le génotype Kitaake possède l'haplotype *NMS1-1* alors que les voisins réduisant sa sensibilité ont l'haplotype *NMS1-3*: le locus *NMS1* ne correspond donc pas à un locus de type barbe verte pour lequel il est attendu que les individus collaborant (ici sensibilité réduite) possèdent le même haplotype.

IV. La NMS est-elle une opportunité pour l'agriculture de demain ?

En agriculture, l'utilisation de plante voisine comme moyen d'aide à la culture d'une plante d'intérêt n'est pas nouvelle. L'utilisation de plantes compagnes dans des systèmes productifs a surtout été étudiée dans le cas d'associations de plusieurs espèces (intercropping) et a conduit à l'idée de « plante de service » (Dabney *et al.*, 2001).

En effet, les associations d'espèces apparaissent, en agriculture conventionnelle, comme un moyen efficace pour produire autant (rendement, teneur en protéines) que la moyenne des cultures pures avec beaucoup moins d'intrants (Naudin et al., 2010; Pelzer et al., 2012). De plus, elles peuvent fournir d'autres services agro-écologiques utiles, comme dans le cas d'associations céréale-légumineuse où la légumineuse est une plante de couverture qui peut rester en place à la récolte de la céréale, et ce jusqu'à l'implantation de la culture suivante. Ceci assure des fonctions agro-écologiques à l'échelle du cycle de la céréale et à plus long terme une réduction des infestations d'adventices, une régulation des bio-agresseurs, le piégeage du nitrate excédentaire, une contribution au stock d'azote organique du sol, un maintien/amélioration de la structure du sol et une augmentation de la biodiversité sur la parcelle agricole (Corre-Hellou et al., 2013). Les associations de plusieurs espèces ont d'ailleurs montré de nombreuses fois leur impact sur les maladies et la pression des herbivores comme nous l'avons déjà vu (Barbosa et al., 2009; Boudreau, 2013; Zhu & Morel, 2019).

Concernant les mélanges de variétés de la même espèce, de multiples avantages pour l'agriculture ont été démontrés en introduction de ce manuscrit. Pour rappel, les mélanges variétaux peuvent permettre de fournir de nombreux services agro-écologiques en augmentant la durabilité, la performance mais aussi la résilience des systèmes agricoles (Brooker et al., 2008; Bommarco et al., 2013). Ils ont été appliqués avec succès et ont permis d'augmenter la productivité moyenne de 2,2% (Barot et al., 2017; Reiss & Drinkwater, 2018; Borg et al., 2018) même si cette augmentation reste très variable selon les cas (Borg et al., 2018). Au niveau de la réponse des plantes aux stress biotiques en général, la contribution des mélanges variétaux à la résistance des cultures aux agents pathogènes et ravageurs est bien établie (Stenberg, 2017). En effet, dans l'énorme majorité des cas, un système agricole utilisant le mélange de variétés permet une réduction de l'impact des maladies (Zhu et al., 2000; Kristoffersen et al., 2020), des ravageurs (Grettenberger & Tooker, 2015) et des adventices (Xu et al., 2021), par les divers mécanismes présentés en introduction.

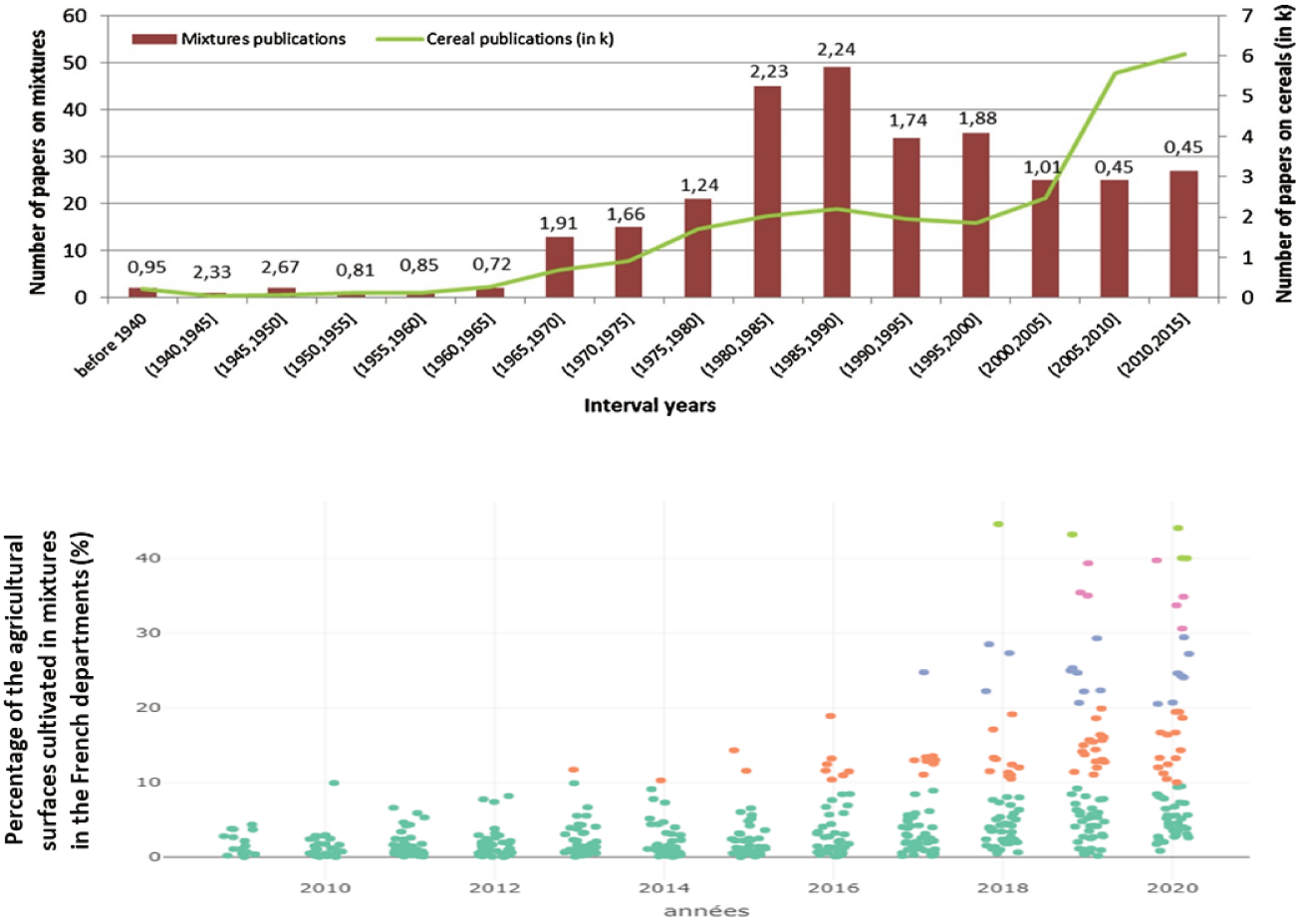


Figure 23. Intérêt scientifique et agronomique pour les mélanges variétaux

(a) Evolution du nombre d'articles scientifiques traitant des mélanges variétaux dans la littérature (barre rouge) comparé au nombre de publications consacrées aux céréales sur la même période (1940 – 2015) (Borg et al. 2018).

(b) Evolution du pourcentage de surface agricole de blés cultivée en mélanges sur l'ensemble des surfaces de blés cultivées dans les départements français entre 2010 et 2020 (d'après Peronne et al . 2017).

IV.1. Freins techniques et économiques à l'utilisation de la diversité génétique en agriculture

Malgré l'ensemble des effets positifs listés ci-dessus, les surfaces cultivées en mélanges restent encore faibles. Par exemple en 2019, les surfaces de blé tendre cultivé en mélange représentaient seulement 12 % (FranceAgrimer, Juillet 2019) (**Figure.23**) des surfaces cultivées de blé tendre. Cependant cette surface a été multiplié par 30 en 20 ans, démontrant un récent engouement pour les mélanges variétaux (La France Agricole, 2017). Les raisons de cette faible proportion ne sont donc pas le manque d'intérêt des agriculteurs, en effet, une enquête réalisée auprès des riziculteurs de Camargue indique que les acteurs en amont de la filière de production

(sélectionneurs, semenciers, riziculteurs) sont majoritairement favorables, au contraire des acteurs en aval de la filière (collecteurs, transformateurs) (enquête des étudiants SUPAGRO, 2019).

Du point de vue des pratiques agricoles, la conception des mélanges est mal documentée, de nombreuses méthodes existent, mais peu de comparaisons ont été effectuées entre les différentes techniques (mélange binaire de variétés en rangée, mélange binaire aléatoire, semis de variétés population etc…). De plus techniquement, les mélanges représentent de nombreux défis, par exemple il est nécessaire de semer des variétés homogènes dans leur maturité au risque d'en voir une prendre l'avantage lors de l'émergence, mais aussi pour que la date de maturité des grains soit identique pour procéder à une récolte unique des variétés en mélange. Economiquement, les filières de transformation en aval continuent de dissuader les agriculteurs de semer des parcelles en mélanges. En effet ces filières fonctionnent sur des procédés industriels basés sur des lots de grains homogènes pour assurer la qualité des semoules ou des farines (taux de protéines par exemple). Enfin d'un point de vue législatif, la loi française a longtemps interdit la commercialisation de semences hétérogènes avant de finalement autoriser leur mise sur le marché depuis 2018.

IV.2. Opportunité et perspectives de recherche pour l'introduction de la NMS dans les programme de sélection

L'acceptation et l'utilisation des mélanges variétaux sont donc en progrès, notamment depuis une dizaine d'années. De nombreuses questions subsistent sur le choix des variétés à mettre en mélange et leurs proportions dans un système diversifié intra-spécifique (Litrico & Violle, 2015). Peut-on imaginer à terme utiliser les phénomènes de NMS comme moyen d'optimiser ces mélanges? Notre étude fournit de nouveaux éléments de réflexion sur ces questions. En effet, ce travail de thèse montre que, en réalisant des expériences rapides en serre, on peut sélectionner des paires de génotypes diminuant la sensibilité du mélange par une utilisation des interactions plante-plante. De tels effets positifs de NMS viendraient dans la s'ajouter aux processus épidémiologiques de dilutions ou de barrières déjà présents en condition naturelle, et permettre une gestion plus durable des agents pathogènes dans les champs. Cela offrirait ainsi l'opportunité d'effectuer une sélection plus dirigée des associations à cultiver en mélange, un paramètre qui, jusqu'à présent, a été majoritairement laissé au hasard.

Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour arriver à cet objectif d'aide à la sélection. Tout d'abord, notre étude manque d'une validation en condition naturelle. Pour commencer, il faudrait vérifier que nos effets de NMS peuvent être observés au champs où les processus épidémiologiques viendront brouiller, voire entièrement masquer, les effets dus à la NMS. Il y a là un défi méthodologique important qui sera complexe à relever, même si des études sur les interactions plante-plante au champs ont pu aboutir (Montazeaud et al . 2021).

IV.2.1. Bien choisir la diversité génétique en amont pour effectuer les premiers tests

Avant de pouvoir utiliser au champs les effets des interactions entre les plantes sur la sensibilité contre les pathogènes, il faut sélectionner des paires de génotypes ayant des effets bénéfiques supérieurs à la moyenne des deux cultures pures en conditions contrôlées. Nos résultats montrent que de tels effets bénéfiques peuvent être trouvés chez le blé et le riz, chez les variétés « élites » issues des programmes de sélection variétales pour leurs performances agronomiques. Chez le riz, nous avons notamment montré l'existence du locus *NMS1*, génétiquement lié au déclenchement de la NMS. Néanmoins nos résultats pointent aussi que les effets de NMS ont plus de chance d'être détectés dans des populations n'ayant pas subi de processus de sélection variétale, comme la variété population de riz Acuce, et la population EPO de blé, conçue pour maximiser la diversité génétique. Ceci indique que les différents mécanismes, encore inconnus à ce jour (coopération sociale, production de molécules allélopathiques, phénomène de reconnaissance etc …), susceptibles de provoquer les réactions de NMS ont peut-être été contre-sélectionnés avec le temps. Une solution à ce problème serait d'intégrer au programme de sélection des mesures du comportement des variétés en mélanges en terme de résistance, mais aussi en terme de production, et peut-être de repartir de populations ancestrales pour régénérer des variétés à fort potentiel agronomique et favorisant les effets bénéfiques des interactions avec les autres plantes.

IV.2.2. Mesurer le pour et le contre des interactions plante-plante sur la santé globale des cultures

Afin d'exploiter au mieux les effets des interactions plante-plante dans les mélanges variétaux, il sera primordial d'évaluer l'impact de l'association en question sur les autres facteurs impactant les cultures agronomiques comme les effets de la NMS sur la composition du microbiote, la pression des adventices, l'exploitation des ressources du sol, la tolérance des plantes au stress abiotiques et le rendement des plantes.

Mais il sera surtout important d'évaluer l'effet des interactions sur la sensibilité à l'ensemble des agents pathogènes rencontrés sur le terrain. En effet, nos résultats indiquent que pour

certaines associations, voir certaines populations (de blé notamment), la baisse de sensibilité à un agent pathogène peut induire une augmentation de sensibilité à un autre agent pathogène, aux mécanismes d'infection et au mode trophique différents. Il est donc primordial d'utiliser des associations ayant des effets bénéfiques sur les pressions des agents pathogènes majoritaires dans les régions où l'on veut introduire le mélange. De ce point de vue-là, l'utilisation de la NMS pour augmenter la résistance se heurtera sans doute aux même problèmes rencontrés avec l'utilisation des éliciteurs des défenses des plantes, qui ont aussi déjà montré des effets opposés sur la sensibilité des plantes à différents agents pathogènes (Verly et al., 2020).

IV.2.3. Observer et contrôler les conséquences à long terme de l'introduction de la NMS.

Dans l'optique de promouvoir la NMS comme un nouveau moyen de biocontrôle durable des agents pathogènes il est aussi nécessaire d'observer ces effets sur l'évolution de ces derniers. En effet, la dynamique des populations des agents pathogènes est intimement liée à la dynamique et aux résistances des populations des plantes hôtes (Thines, 2014), l'introduction de la NMS dans les systèmes agronomiques risque de modifier la répartition et la pression de certains agents pathogènes. La NMS ayant des impacts contrastés sur la sensibilité à différents agents pathogènes, elle risque de limiter l'incidence de certaines maladies en en favorisant d'autres. Ce genre de phénomène a déjà été observé en agriculture où l'introduction de la résistance *mlo* contre le mildiou de l'orge a favorisé l'émergence de nouvelles maladies comme la pyriculariose et la ramulariose (Jarosch et al., 1999; McGrann et al., 2014). Afin d'éviter l'émergence de maladies trop dommageables pour l'agriculture, les associations devront donc être adaptées en fonction de la pression présente pathogène sur le site d'intérêt.

Conclusion générale

Dans les années à venir, les changements climatiques risquent d'augmenter la fréquence et l'incidence des épidémies d'agents pathogènes des végétaux (Evans et al., 2008). En parallèle, les politiques agricoles visant à réduire les intrants dans les systèmes agricoles, comme les pesticides chimiques, vont augmenter la pression des agents pathogènes sur les cultures (van Bruggen & Finckh, 2016). Dans ce contexte, notre système agricole a sans cesse besoin de se renouveler et d'innover afin d'assurer sa pérennité (Tilman et al., 2002) ainsi que la sécurité alimentaire des populations (Godfray et al., 2010).

Les mélanges variétaux sont un bon moyen pour augmenter la durabilité et la productivité de nos systèmes agronomiques et connaissent un regain d'intérêt ces dernières années. Néanmoins de nombreux obstacles et interrogations subsistent, ce qui rend leur mis en place à grand échelle difficile. Dans cette thèse, nous montrons que la sensibilité des plantes peut être modulée par les interactions plante-plante dans un système diversifié intra-spécifique. Sans comprendre en détail encore pourquoi et comment les plantes modifient la sensibilité de leur voisine, notre étude apporte de nouveaux éléments sur les mécanismes physiologiques, moléculaires et génétiques sous-jacents à ce phénomène. Ces découvertes méritent d'être approfondies, pour capter la complexité des signaux échangés entre les plantes d'une part mais aussi pour s'assurer de leur transférabilité en situation agricole.

Les observations réalisées constituent une base solide qui permet déjà d'envisager d'utiliser les interactions entre les plantes pour l'amélioration de la sélection des génotypes à cultiver en mélanges. En milieu naturel, la superposition des mécanismes d'interactions plante-plante aux effets de la diversité intra-spécifique sur la dispersion et la reproduction des agents pathogènes pourrait donc constituer un nouveau moyen efficace de contrôler les maladies des végétaux.

Bibliographie

Ahn I-P, Kim S, Kang S, Suh S-C, Lee Y-H. **2005**. Rice Defense Mechanisms Against Cochliobolus miyabeanus and Magnaporthe grisea Are Distinct. *Phytopathology* **95**: 1248–1255.

Aljbory Z, Chen M-S. **2018**. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science* **25**: 2–23.

Amb MK, Ahluwalia AS. **2016**. Allelopathy: Potential Role to Achieve New Milestones in Rice Cultivation. *Rice Science* **23**: 165–183.

Ameye M, Audenaert K, De Zutter N, Steppe K, Van Meulebroek L, Vanhaecke L, De Vleesschauwer D, Haesaert G, Smagghe G. **2015**. Priming of Wheat with the Green Leaf Volatile *Z* -3-Hexenyl Acetate Enhances Defense against *Fusarium graminearum* But Boosts Deoxynivalenol Production. *Plant Physiology* **167**: 1671–1684.

Anten NPR, Chen BJW. **2021**. Detect thy family: Mechanisms, ecology and agricultural aspects of kin recognition in plants. *Plant, Cell & Environment* **44**: 1059–1071.

Anten NPR, Vermeulen PJ. **2016**. Tragedies and Crops: Understanding Natural Selection To Improve Cropping Systems. *Trends in Ecology & Evolution* **31**: 429–439.

Arbona V, Manzi M, Zandalinas SI, Vives-Peris V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A. **2017**. Physiological, Metabolic, and Molecular Responses of Plants to Abiotic Stress. In: Sarwat M, Ahmad A, Abdin MZ, Ibrahim MM, eds. Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 2. Cham: Springer International Publishing, 1–35.

Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyozuka J. **2009**. d14, a Strigolactone-Insensitive Mutant of Rice, Shows an Accelerated Outgrowth of Tillers. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1416–1424.

Augner M, Fagerstr**m T, Tuomi J**. **1991**. Competition, defense and games between plants. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **29**: 231–234.

Awty-Carroll D, Hauck B, Clifton-Brown J, Robson P. **2020**. Allelopathic and intraspecific growth competition effects establishment of direct sown Miscanthus. *GCB Bioenergy* **12**: 396–409.

van Baalen M, Rand DA. **1998**. The Unit of Selection in Viscous Populations and the Evolution of Altruism. *Journal of Theoretical Biology* **193**: 631–648.

Bais HP. **2018**. We are family: kin recognition in crop plants. *New Phytologist* **220**: 357–359.

Ballaré CL. **2014**. Light Regulation of Plant Defense. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 335–363.

Ballini E, Nguyen TT, Morel J-B. **2013**. Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice* **6**: 32.

Ballini E, Tavaud M, Ducasse A, Sanchez D, Paux E, Kitt J, Charmet G, Audigeos D, Roumet P, David J, *et al.* 2020. Genome wide association mapping for resistance to multiple fungal pathogens in a panel issued from a broad composite cross-population of tetraploid wheat Triticum turgidum. *Euphytica* **216**: 92.

Baluška F, Mancuso S. **2009**. Plant neurobiology: from sensory biology, via plant communication, to social plant behavior. *Cognitive Processing* **10**: 3–7.

Bancal M-O. **2021**. Plant–plant communication in variety mixtures plays on disease susceptibility and immunity. *Journal of Experimental Botany* **72**: 6084–6086.

Barbosa P, Hines J, Kaplan I, Martinson H, Szczepaniec A, Szendrei Z. **2009**. Associational Resistance and Associational Susceptibility: Having Right or Wrong Neighbors. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**: 1–20.

Barot S, Allard V, Cantarel A, Enjalbert J, Gauffreteau A, Goldringer I, Lata J-C, Le Roux X, Niboyet A, Porcher E. **2017**. Designing mixtures of varieties for multifunctional agriculture with the help of ecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **37**: 13.

Bashir K, Matsui A, Rasheed S, Seki M. **2019**. Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought, salinity, heat, and cold stress. *F1000Research* **8**: F1000 Faculty Rev-658.

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. **2015**. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**: 1–48.

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun M-H, Tharreau D. **2003**. Identification and fine mapping of Pi33, the rice resistance gene corresponding to the Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 1139–1147.

Bidzinski P, Ballini E, Ducasse A, Michel C, Zuluaga P, Genga A, Chiozzotto R, Morel J-B. **2016**. Transcriptional Basis of Drought-Induced Susceptibility to the Rice Blast Fungus Magnaporthe oryzae. *Frontiers in Plant Science* **7**.

Biedrzycki ML, Bais HP. **2010**. Kin recognition in plants: a mysterious behaviour unsolved. *Journal of Experimental Botany* **61**: 4123–4128.

Biedrzycki ML, Jilany TA, Dudley SA, Bais HP. **2010**. Root exudates mediate kin recognition in plants. *Communicative & Integrative Biology* **3**: 28–35.

Biedrzycki ML, L V, Bais HP. **2011**. Transcriptome analysis of Arabidopsis thaliana plants in response to kin and stranger recognition. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1515–1524.

Bijma P. **2014**. The quantitative genetics of indirect genetic effects: a selective review of modelling issues. *Heredity* **112**: 61–69.

Bilas RD, Bretman A, Bennett T. **2021**. Friends, neighbours and enemies: an overview of the communal and social biology of plants. *Plant, Cell & Environment* **44**: 997–1013.

Bolton MD, Kolmer JA, Garvin DF. **2008**. Wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. *Molecular Plant Pathology* **9**: 563–575.

Bommarco R, Kleijn D, Potts SG. **2013**. Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends in Ecology & Evolution* **28**: 230–238.

Borg J, Kiær LP, Lecarpentier C, Goldringer I, Gauffreteau A, Saint-Jean S, Barot S, Enjalbert J. **2018**. Unfolding the potential of wheat cultivar mixtures: A meta-analysis perspective and identification of knowledge gaps. *Field Crops Research* **221**: 298–313.

Boudreau MA. **2013**. Diseases in Intercropping Systems. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 499–519.

Bowsher AW, Shetty P, Anacker BL, Siefert A, Strauss SY, Friesen ML. **2017**. Transcriptomic responses to conspecific and congeneric competition in co-occurring Trifolium. *Journal of Ecology* **105**: 602–615.

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. **2007**. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **23**: 2633–2635.

Brauc S, De Vooght E, Claeys M, Höfte M, Angenon G. **2011**. Influence of over-expression of cytosolic aspartate aminotransferase on amino acid metabolism and defence responses against Botrytis cinerea infection in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1813–1819.

Brooker RW, Maestre FT, Callaway RM, Lortie CL, Cavieres LA, Kunstler G, Liancourt P, Tielbörger K, Travis JMJ, Anthelme F, *et al.* 2008. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of Ecology* **96**: 18–34.

Broz AK, Broeckling CD, De-la-Peña C, Lewis MR, Greene E, Callaway RM, Sumner LW, Vivanco JM. **2010**. Plant neighbor identity influences plant biochemistry and physiology related to defense. *BMC Plant Biology* **10**: 115.

van Bruggen AHC, Finckh MR. **2016**. Plant Diseases and Management Approaches in Organic Farming Systems. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 25–54.

Burdon JJ, Barrett LG, Rebetzke G, Thrall PH. **2014**. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications* **7**: 609–624.

Callaway RM, Brooker RW, Choler P, Kikvidze Z, Lortie CJ, Michalet R, Paolini L, Pugnaire FI, Newingham B, Aschehoug ET, *et al.* 2002. Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature* **417**: 844–848.

Campos ML, Yoshida Y, Major IT, de Oliveira Ferreira D, Weraduwage SM, Froehlich JE, Johnson BF, Kramer DM, Jander G, Sharkey TD, *et al.* 2016. Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nature Communications* **7**: 12570.

Campos-Soriano L, Bundó M, Bach-Pages M, Chiang S-F, Chiou T-J, Segundo BS. **2020**. Phosphate excess increases susceptibility to pathogen infection in rice. *Molecular Plant Pathology* **21**: 555–570.

Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, Demkura PV, de Wit M, Patitucci MS, Pierik R, Pieterse CMJ, Ballaré CL. **2012**. Low Red/Far-Red Ratios Reduce Arabidopsis Resistance to

Botrytis cinerea and Jasmonate Responses via a COI1-JAZ10-Dependent, Salicylic Acid-Independent Mechanism1[C][W][OA]. *Plant Physiology* **158**: 2042–2052.

Chan C, Liao Y-Y, Chiou T-J. **2021**. The Impact of Phosphorus on Plant Immunity. *Plant & Cell Physiology*: pcaa168.

Chehab EW, Yao C, Henderson Z, Kim S, Braam J. **2012**. Arabidopsis Touch-Induced Morphogenesis Is Jasmonate Mediated and Protects against Pests. *Current Biology* **22**: 701–706.

Chen BJW, Hajiboland R, Bahrami-Rad S, Moradtalab N, Anten NPR. **2019**. Presence of Belowground Neighbors Activates Defense Pathways at the Expense of Growth in Tobacco Plants. *Frontiers in Plant Science* **10**.

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T. **2007**. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.

Cohen SP, Leach JE. **2019**. Abiotic and biotic stresses induce a core transcriptome response in rice. *Scientific Reports* **9**: 6273.

Colhoun J. **1973**. Effects of Environmental Factors on Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* **11**: 343–364.

Conrath U. **2011**. Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* **16**: 524–531.

Coppola M, Cascone P, Madonna V, Di Lelio I, Esposito F, Avitabile C, Romanelli A, Guerrieri E, Vitiello A, Pennacchio F, *et al.* 2017. Plant-to-plant communication triggered by systemin primes anti-herbivore resistance in tomato. *Scientific Reports* **7**: 15522.

Corre-Hellou G, Bedoussac L, Bousseau D, Chaigne G, Chataigner C, Celette F, Cohan J-P, Coutard J-P, Emile JC, Floriot M, *et al.* 2013. Associations céréale-légumineuse multi-services. *Innovations Agronomiques* **30**: 41–57.

Cortes LT, Zhang Z, Yu J. **2021**. Status and prospects of genome-wide association studies in plants. *The Plant Genome* **14**: e20077.

Courtois B, Frouin J, Greco R, Bruschi G, Droc G, Hamelin C, Ruiz M, Clément G, Evrard J-C, Coppenole S van, *et al.* 2012. Genetic Diversity and Population Structure in a European Collection of Rice. *Crop Science* **52**: 1663–1675.

Cowger C, Mundt CC. **2002**. Effects of Wheat Cultivar Mixtures on Epidemic Progression of Septoria Tritici Blotch and Pathogenicity of Mycosphaerella graminicola. *Phytopathology®* **92**: 617–623.

Cremer S. **2019**. Social immunity in insects. *Current Biology* **29**: R458–R463.

Cremer S, Pull CD, Fürst MA. **2018**. Social Immunity: Emergence and Evolution of Colony-Level Disease Protection. *Annual Review of Entomology* **63**: 105–123.

Crepy MA, Casal JJ. **2015**. Photoreceptor-mediated kin recognition in plants. *New Phytologist* **205**: 329–338.

Curtis H, Noll U, Störmann J, Slusarenko AJ. **2004**. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (Allium sativum L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 79–89.

Dabney SM, Delgado JA, Reeves DW. **2001**. Using Winter Cover Crops to Improve Soil and Water Quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **32**: 1221–1250.

Darwin C, Wallace AR. **1958**. Evolution by natural selection. *Evolution by natural selection.*

David J, Holtz Y, Ranwez V, Santoni S, Sarah G, Ardisson M, Poux G, Choulet F, Genthon C, Roumet P, *et al.* 2014. Genotyping by sequencing transcriptomes in an evolutionary pre-breeding durum wheat population. *Molecular Breeding* **34**: 1531–1548.

De Vleesschauwer D, Gheysen G, Höfte M. **2013a**. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science* **18**: 555–565.

De Vleesschauwer D, Gheysen G, Höfte M. **2013b**. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science* **18**: 555–565.

De Vleesschauwer D, Xu J, Höfte M. **2014**. Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Delory BM, Delaplace P, Fauconnier M-L, du Jardin P. **2016**. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? *Plant and Soil* **402**: 1–26.

Delteil A, Blein M, Faivre-Rampant O, Guellim A, Estevan J, Hirsch J, Bevitori R, Michel C, Morel J-B. **2012**. Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. *Molecular Plant Pathology* **13**: 72–82.

Ding X, Yang M, Huang H, Chuan Y, He X, Li C, Zhu Y, Zhu S. **2015**. Priming maize resistance by its neighbors: activating 1,4-benzoxazine-3-ones synthesis and defense gene expression to alleviate leaf disease. *Frontiers in Plant Science* **6**.

Dini-Andreote F. **2020**. Endophytes: The Second Layer of Plant Defense. *Trends in Plant Science* **25**: 319–322.

Donaldson JR, Kruger EL, Lindroth RL. **2006**. Competition- and resource-mediated tradeoffs between growth and defensive chemistry in trembling aspen (Populus tremuloides). *New Phytologist* **169**: 561–570.

Dong N, Tang M-M, Zhang W-P, Bao X-G, Wang Y, Christie P, Li L. **2018**. Temporal Differentiation of Crop Growth as One of the Drivers of Intercropping Yield Advantage. *Scientific Reports* **8**: 3110.

Dordas C. **2008**. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **28**: 33–46.

Douma JC, Anten NPR. **2019**. Touch and plant defence: volatile communication with neighbours. *Journal of Experimental Botany* **70**: 371–374.

Dudley SA. **2015**. Plant cooperation. *AoB PLANTS* **7**.

Dudley SA, File AL. **2007**. Kin recognition in an annual plant. *Biology Letters* **3**: 435–438.

Dudley SA, Murphy GP, File AL. **2013**. Kin recognition and competition in plants. *Functional Ecology* **27**: 898–906.

El Kasmi F, Horvath D, Lahaye T. **2018**. Microbial effectors and the role of water and sugar in the infection battle ground. *Current Opinion in Plant Biology* **44**: 98–107.

Endelman JB, Jannink J-L. **2012**. Shrinkage Estimation of the Realized Relationship Matrix. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **2**: 1405–1413.

Ervin GN, Wetzel RG. **2000**. Allelochemical autotoxicity in the emergent wetland macrophyte Juncus effusus (Juncaceae). *American Journal of Botany* **87**: 853–860.

Evans N, Baierl A, Semenov MA, Gladders P, Fitt BDL. **2008**. Range and severity of a plant disease increased by global warming. *Journal of The Royal Society Interface* **5**: 525–531.

Fan J, Bai P, Ning Y, Wang J, Shi X, Xiong Y, Zhang K, He F, Zhang C, Wang R, *et al.* 2018. The Monocot-Specific Receptor-like Kinase SDS2 Controls Cell Death and Immunity in Rice. *Cell host & microbe* **23**: 498-510.e5.

Fang S, Clark RT, Zheng Y, Iyer-Pascuzzi AS, Weitz JS, Kochian LV, Edelsbrunner H, Liao H, Benfey PN. **2013**. Genotypic recognition and spatial responses by rice roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 2670–2675.

Farooq N, Abbas T, Tanveer A, Jabran K. **2020**. Allelopathy for Weed Management. In: Mérillon J-M, Ramawat KG, eds. Reference Series in Phytochemistry. Co-Evolution of Secondary Metabolites. Cham: Springer International Publishing, 505–519.

Fernandez C, Monnier Y, Santonja M, Gallet C, Weston LA, Prévosto B, Saunier A, Baldy V, Bousquet-Mélou A. **2016**. The Impact of Competition and Allelopathy on the Trade-Off between Plant Defense and Growth in Two Contrasting Tree Species. *Frontiers in Plant Science* **7**.

Fernandez J, Orth K. **2018**. Rise of a Cereal Killer: The Biology of Magnaporthe oryzae Biotrophic Growth. *Trends in Microbiology* **26**: 582–597.

Fernández-Aparicio M, Amri M, Kharrat M, Rubiales D. **2010**. Intercropping reduces Mycosphaerella pinodes severity and delays upward progress on the pea plant. *Crop Protection* **29**: 744–750.

Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR. **2006**. Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 505–524.

File Amanda L., Murphy Guillermo P., Dudley Susan A. 2012. Fitness consequences of plants growing with siblings: reconciling kin selection, niche partitioning and competitive ability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 209–218.

Frank SA. **2007**. All of life is social. *Current Biology* **17**: R648–R650.

Freschet GT, Swart EM, Cornelissen JHC. **2015**. Integrated plant phenotypic responses to contrasting above- and below-ground resources: key roles of specific leaf area and root mass fraction. *New Phytologist* **206**: 1247–1260.

Fréville H, Roumet P, Rode NO, Rocher A, Latreille M, Muller M, David J. **2019**. Preferential helping to relatives: A potential mechanism responsible for lower yield of crop variety mixtures? *Evolutionary Applications* **12**: 1837–1849.

Frontini M, Boisnard A, Frouin J, Ouikene M, Morel JB, Ballini E. **2021**. Genome-wide association of rice response to blast fungus identifies loci for robust resistance under high nitrogen. *BMC Plant Biology* **21**: 99.

Frouin J, Languillaume A, Mas J, Mieulet D, Boisnard A, Labeyrie A, Bettembourg M, Bureau C, Lorenzini E, Portefaix M, *et al.* 2018. Tolerance to mild salinity stress in japonica rice: A genome-wide association mapping study highlights calcium signaling and metabolism genes. *PLOS ONE* **13**: e0190964.

Gaba S, Lescourret F, Boudsocq S, Enjalbert J, Hinsinger P, Journet E-P, Navas M-L, Wery J, Louarn G, Malézieux E, *et al.* 2015. Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. *Agronomy for Sustainable Development* **35**: 607–623.

Gallet R, Fontaine C, Bonnot F, Milazzo J, Tertois C, Adreit H, Ravigné V, Fournier E, Tharreau D. **2015**. Evolution of Compatibility Range in the Rice−Magnaporthe oryzae System: An Uneven Distribution of R Genes Between Rice Subspecies. *Phytopathology*® **106**: 348–354.

Gardner A. **2019a**. The greenbeard effect. *Current Biology* **29**: R430–R431.

Gardner A. **2019b**. The greenbeard effect.

Garrett KA, Mundt CC. **1999**. Epidemiology in Mixed Host Populations. *Phytopathology* **89**: 984–990.

Gaudet M, Pietrini F, Beritognolo I, Iori V, Zacchini M, Massacci A, Mugnozza GS, Sabatti M. **2011**. Intraspecific variation of physiological and molecular response to cadmium stress in Populus nigra L. *Tree Physiology* **31**: 1309–1318.

Ge X-YM, Scholl JP, Basinger U, Huxman TE, Venable DL. **2019**. Functional trait trade-off and species abundance: insights from a multi-decadal study. *Ecology Letters* **22**: 583–592.

Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. **2010**. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* **327**: 812–818.

Grassini P, Eskridge KM, Cassman KG. **2013**. Distinguishing between yield advances and yield plateaus in historical crop production trends. *Nature Communications* **4**: 2918.

Grettenberger IM, Tooker JF. **2015**. Moving beyond resistance management toward an expanded role for seed mixtures in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **208**: 29–36.

Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P. **2017**. Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology* **55**: 565–589.

Hall DW, Goodisman MAD. **2012**. The Effects of Kin Selection on Rates of Molecular Evolution in Social Insects. *Evolution* **66**: 2080–2093.

Hamilton WD. **1964a**. The genetical evolution of social behaviour. *I. J. Theor. Biol.*: 1–16.

Hamilton WD. **1964b**. The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of Theoretical Biology* **7**: 17–52.

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

Haney CH, Ausubel FM. **2015**. Plant microbiome blueprints. *Science* **349**: 788–789.

Hauggaard-Nielsen H, Jørnsgaard B, Kinane J, Jensen ES. **2008**. Grain legume–cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems* **23**: 3–12.

Haun JR. **1973**. Visual Quantification of Wheat Development1. *Agronomy Journal* **65**: 116–119.

Heath MC. **2000**. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 315–319.

Henry L, Morel J, Buendia L. **2020**. Exploring physiological traits for measuring response to competition in durum wheat. *Plant Signaling & Behavior* **15**: 1692459.

Hickman DT, Rasmussen A, Ritz K, Birkett MA, Neve P. **2021**. Review: Allelochemicals as multi-kingdom plant defence compounds: towards an integrated approach. *Pest Management Science* **77**: 1121–1131.

Howe GA, Jander G. **2008**. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 41–66.

Hu L, Robert CAM, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Manzo D, Chervet N, Steinger T, van der Heijden MGA, *et al.* 2018. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications* **9**: 1–13.

Hua J. **2013**. Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 406–413.

Huang H, Nguyen Thi Thu T, He X, Gravot A, Bernillon S, Ballini E, Morel J-B. **2017**. Increase of Fungal Pathogenicity and Role of Plant Glutamine in Nitrogen-Induced Susceptibility (NIS) To Rice Blast. *Frontiers in Plant Science* **8**: 265.

Huang S, Zhang X, Fernando WGD. **2020**. Directing Trophic Divergence in Plant-Pathogen Interactions: Antagonistic Phytohormones With NO Doubt? *Frontiers in Plant Science* **11**: 600063.

Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. **2014**. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**: 1267–1287.

Irani S, Todd CD. **2018**. Exogenous allantoin increases Arabidopsis seedlings tolerance to NaCl stress and regulates expression of oxidative stress response genes. *Journal of Plant Physiology* **221**: 43–50.

Jabran K, Mahajan G, Sardana V, Chauhan BS. **2015**. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection* **72**: 57–65.

Jandová K, Dostál P, Cajthaml T, Kameník Z. **2015**. Intraspecific variability in allelopathy of Heracleum mantegazzianum is linked to the metabolic profile of root exudates. *Annals of Botany* **115**: 821–831.

Jarosch B, Kogel K-H, Schaffrath U. **1999**. The Ambivalence of the Barley Mlo Locus: Mutations Conferring Resistance Against Powdery Mildew (Blumeria graminis f. sp. hordei) Enhance Susceptibility to the Rice Blast Fungus Magnaporthe grisea. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **12**: 508–514.

Jenkins M. **2003**. Prospects for Biodiversity. *Science* **302**: 1175–1177.

Jones JDG, Dangl JL. **2006**. The plant immune system. *Nature* **444**: 323.

Jumpponen A, Mulder CPH, Huss-Danell K, Högberg P. **2005**. Winners and losers in herbaceous plant communities: insights from foliar carbon isotope composition in monocultures and mixtures. *Journal of Ecology* **93**: 1136–1147.

Kadotani N, Akagi A, Takatsuji H, Miwa T, Igarashi D. **2016**. Exogenous proteinogenic amino acids induce systemic resistance in rice. *BMC Plant Biology* **16**: 60.

Kahlon PS, Stam R. **2021**. Polymorphisms in plants to restrict losses to pathogens: From gene family expansions to complex network evolution. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102040.

Karasov T, Chae E, Herman J, Bergelson J. **2017**. Mechanisms to Mitigate the Tradeoff between Growth and Defense. *The Plant Cell*: tpc.00931.2016.

Karban R, Shiojiri K, Huntzinger M, McCall AC. **2006**. Damage-induced resistance in sagebrush: volatiles are key to intra- and interplant communication. *Ecology* **87**: 922–930.

Karban R, Shiojiri K, Ishizaki S, Wetzel WC, Evans RY. **2013**. Kin recognition affects plant communication and defence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20123062.

Katagiri F, Tsuda K. **2010**. Understanding the Plant Immune System. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* **23**: 1531–1536.

Kato-Noguchi H. **2011**. Barnyard grass-induced rice allelopathy and momilactone B. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1016–1020.

Kato-Noguchi H, Ino T, Sata N, Yamamura S. **2002**. Isolation and identification of a potent allelopathic substance in rice root exudates. *Physiologia Plantarum* **115**: 401–405.

Kato-Noguchi H, Moriyasu M, Ohno O, Suenaga K. **2014**. Growth limiting effects on various terrestrial plant species by an allelopathic substance, loliolide, from water hyacinth. *Aquatic Botany* **117**: 56–61.

Kato-Noguchi H, Peters RJ. **2013**. The Role of Momilactones in Rice Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* **39**: 175–185.

Keesstra S, Nunes J, Novara A, Finger D, Avelar D, Kalantari Z, Cerdà A. **2018**. The superior effect of nature based solutions in land management for enhancing ecosystem services. *Science of The Total Environment* **610–611**: 997–1009.

Khush GS, Jena KK. **2009**. Current Status and Future Prospects for Research on Blast Resistance in Rice (Oryza sativa L.). In: Wang G-L, Valent B, eds. Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–10.

Kigathi RN, Weisser WW, Veit D, Gershenzon J, Unsicker SB. **2013**. Plants Suppress Their Emission of Volatiles When Growing with Conspecifics. *Journal of Chemical Ecology* **39**: 537–545.

Kim YS, An C, Park S, Gilmour SJ, Wang L, Renna L, Brandizzi F, Grumet R, Thomashow MF. **2017**. CAMTA-Mediated Regulation of Salicylic Acid Immunity Pathway Genes in Arabidopsis Exposed to Low Temperature and Pathogen Infection[OPEN]. *The Plant Cell* **29**: 2465–2477.

Klemens JA. **2008**. Kin recognition in plants? *Biology Letters* **4**: 67–68.

Kliebenstein DJ. **2016**. False idolatry of the mythical growth versus immunity tradeoff in molecular systems plant pathology. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **95**: 55–59.

Kong C-H, Xuan TD, Khanh TD, Tran H-D, Trung NT. **2019**. Allelochemicals and Signaling Chemicals in Plants. *Molecules* **24**: 2737.

Kong C-H, Zhang S-Z, Li Y-H, Xia Z-C, Yang X-F, Meiners SJ, Wang P. **2018**. Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. *Nature Communications* **9**: 3867.

Kristoffersen R, Jørgensen LN, Eriksen LB, Nielsen GC, Kiær LP. **2020**. Control of Septoria tritici blotch by winter wheat cultivar mixtures: Meta-analysis of 19 years of cultivar trials. *Field Crops Research* **249**: 107696.

Kumar A, Duijnen R van, Delory BM, Reichel R, Brüggemann N, Temperton VM. **2020**. Barley shoot biomass responds strongly to N:P stoichiometry and intraspecific competition, whereas roots only alter their foraging. *bioRxiv*: 2020.01.20.912352.

Lal R. **2007**. Anthropogenic Influences on World Soils and Implications to Global Food Security. In: Sparks DL, ed. Advances in Agronomy. Academic Press, 69–93.

Larimer AL, Bever JD, Clay K. **2010**. The interactive effects of plant microbial symbionts: a review and meta-analysis. *Symbiosis* **51**: 139–148.

Lê Cao K-A, Boitard S, Besse P. **2011**. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* **12**: 253.

Lee D, Polisensky DH, Braam J. **2005**. Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytologist* **165**: 429–444.

Lee D-K, Redillas MCFR, Jung H, Choi S, Kim YS, Kim J-K. **2018**. A Nitrogen Molecular Sensing System, Comprised of the ALLANTOINASE and UREIDE PERMEASE 1 Genes, Can Be Used to Monitor N Status in Rice. *Frontiers in Plant Science* **9**.

Li G, Jain R, Chern M, Pham NT, Martin JA, Wei T, Schackwitz WS, Lipzen AM, Duong PQ, Jones KC, *et al.* 2017. The Sequences of 1504 Mutants in the Model Rice Variety Kitaake Facilitate Rapid Functional Genomic Studies. *The Plant Cell* **29**: 1218–1231.

Li L, Li S-M, Sun J-H, Zhou L-L, Bao X-G, Zhang H-G, Zhang F-S. **2007a**. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 11192–11196.

Li L, Li S-M, Sun J-H, Zhou L-L, Bao X-G, Zhang H-G, Zhang F-S. **2007b**. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 11192–11196.

Li L, Tilman D, Lambers H, Zhang F-S. **2014a**. Plant diversity and overyielding: insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytologist* **203**: 63–69.

Li J-Y, Wang J, Zeigler RS. **2014b**. The 3,000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. *GigaScience* **3**.

Li L, Yang S, Li X, Zhang F, Christie P. **1999**. Interspecific complementary and competitive interactions between intercropped maize and faba bean. *Plant and Soil* **212**: 105–114.

Li L-L, Zhao H-H, Kong C-H. **2020**. (–)-Loliolide, the most ubiquitous lactone, is involved in barnyardgrass-induced rice allelopathy. *Journal of Experimental Botany* **71**: 1540–1550.

Litrico I, Violle C. **2015**. Diversity in Plant Breeding: A New Conceptual Framework. *Trends in Plant Science* **20**: 604–613.

Livak KJ, Schmittgen TD. **2001**. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods* **25**: 402–408.

Loreau M, Hector A. **2001**. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* **412**: 72–76.

Lozano-Durán R, Zipfel C. **2015**. Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* **20**: 12–19.

Lyons NA, Kraigher B, Stefanic P, Mandic-Mulec I, Kolter R. **2016**. A Combinatorial Kin Discrimination System in Bacillus subtilis. *Current Biology* **26**: 733–742.

Mahaut L, Fort F, Violle C, Freschet GT. **2020**. Multiple facets of diversity effects on plant productivity: Species richness, functional diversity, species identity and intraspecific competition. *Functional Ecology* **34**: 287–298.

Mansueto L, Fuentes RR, Borja FN, Detras J, Abriol-Santos JM, Chebotarov D, Sanciangco M, Palis K, Copetti D, Poliakov A, *et al.* 2017. Rice SNP-seek database update: new SNPs, indels, and queries. *Nucleic Acids Research* **45**: D1075–D1081.

Markovic D, Colzi I, Taiti C, Ray S, Scalone R, Gregory Ali J, Mancuso S, Ninkovic V. **2019**. Airborne signals synchronize the defenses of neighboring plants in response to touch. *Journal of Experimental Botany* **70**: 691–700.

Martínez C, Nieto C, Prat S. **2018**. Convergent regulation of PIFs and the E3 ligase COP1/SPA1 mediates thermosensory hypocotyl elongation by plant phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology* **45**: 188–203.

Masclaux FG, Bruessow F, Schweizer F, Gouhier-Darimont C, Keller L, Reymond P. **2012**. Transcriptome analysis of intraspecific competition in Arabidopsis thaliana reveals organ-specific signatures related to nutrient acquisition and general stress response pathways. *BMC Plant Biology* **12**: 227.

Massalha H, Korenblum E, Tholl D, Aharoni A. **2017**. Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *The Plant Journal* **90**: 788–807.

Matesanz S, Ramírez-Valiente JA. **2019**. A review and meta-analysis of intraspecific differences in phenotypic plasticity: Implications to forecast plant responses to climate change. *Global Ecology and Biogeography* **28**: 1682–1694.

Matsubayashi Y, Yang H, Sakagami Y. **2001**. Peptide signals and their receptors in higher plants. *Trends in Plant Science* **6**: 573–577.

McGrann GRD, Stavrinides A, Russell J, Corbitt MM, Booth A, Chartrain L, Thomas WTB, Brown JKM. **2014**. A trade off between mlo resistance to powdery mildew and increased susceptibility of barley to a newly important disease, Ramularia leaf spot. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1025–1037.

Mehdiabadi NJ, Jack CN, Farnham TT, Platt TG, Kalla SE, Shaulsky G, Queller DC, Strassmann JE. **2006**. Kin preference in a social microbe. *Nature* **442**: 881–882.

Meiners SJ, Kong C-H, Ladwig LM, Pisula NL, Lang KA. **2012**. Developing an ecological context for allelopathy. *Plant Ecology* **213**: 1221–1227.

Mélanger les variétés de blé, une pratique qui monte. *La France Agricole*.

Mengiste T. **2012**. Plant Immunity to Necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 267–294.

Mertens D, Boege K, Kessler A, Koricheva J, Thaler JS, Whiteman NK, Poelman EH. **2021**. Predictability of Biotic Stress Structures Plant Defence Evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **36**: 444–456.

Mitchell AF, Walters DR. **2004**. Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection. *Pest Management Science* **60**: 126–134.

Moore BD, Andrew RL, Külheim C, Foley WJ. **2014**. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist* **201**: 733–750.

Moss B. **2008**. Water pollution by agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**: 659–666.

Mundt CC. **2002**. Use of Multiline Cultivars and Cultivar Mixtures for Disease Management. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 381–410.

Mundt CC. **2014**. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**: 446–455.

Mutic JJ, Wolf JB. **2007**. Indirect genetic effects from ecological interactions in Arabidopsis thaliana. *Molecular Ecology* **16**: 2371–2381.

Nasir F, Tian L, Shi S, Chang C, Ma L, Gao Y, Tian C. **2019**. Strigolactones positively regulate defense against Magnaporthe oryzae in rice (Oryza sativa). *Plant Physiology and Biochemistry* **142**: 106–116.

Naudin C, Corre-Hellou G, Pineau S, Crozat Y, Jeuffroy M-H. **2010**. The effect of various dynamics of N availability on winter pea–wheat intercrops: Crop growth, N partitioning and symbiotic N2 fixation. *Field Crops Research* **119**: 2–11.

Nelson R, Wiesner-Hanks T, Wisser R, Balint-Kurti P. **2018**. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics* **19**: 21–33.

Niculaes C, Abramov A, Hannemann L, Frey M. **2018**. Plant Protection by Benzoxazinoids—Recent Insights into Biosynthesis and Function. *Agronomy* **8**: 143.

Ninkovic V. **2003**. Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1931–1939.

Ninkovic V, Markovic D, Rensing M. **2020**. Plant volatiles as cues and signals in plant communication. *Plant Cell and Environment*.

Ninkovic V, Rensing M, Dahlin I, Markovic D. **2019**. Who is my neighbor? Volatile cues in plant interactions. *Plant Signaling & Behavior* **14**: 1634993.

Nishad R, Ahmed T, Rahman VJ, Kareem A. **2020**. Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Frontiers in Microbiology* **11**: 1298.

Nobori T, Tsuda K. **2019**. The plant immune system in heterogeneous environments. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 58–66.

Olofsdotter M. **2001**. Rice—A Step Toward Use of Allelopathy. *Agronomy Journal* **93**: 3.

Ou SH, Britain. **1985**. *Rice Diseases*. Commonwealth Mycological Institute, IRRI.

Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M. **2017**. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science* **8**.

Pélissier R, Buendia L, Brousse A, Temple C, Ballini E, Fort F, Violle C, Morel J-B. **2021a**. Plant neighbour-modulated susceptibility to pathogens in intraspecific mixtures. *Journal of Experimental Botany* **Volume 72**: Pages 6570-6580.

Pélissier R, Violle C, Morel J-B. **2021b**. Plant immunity: Good fences make good neighbors? *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102045.

Pelzer E, Bazot M, Makowski D, Corre-Hellou G, Naudin C, Al Rifaï M, Baranger E, Bedoussac L, Biarnès V, Boucheny P, *et al.* 2012. Pea–wheat intercrops in low-input

conditions combine high economic performances and low environmental impacts. *European Journal of Agronomy* **40**: 39–53.

Peng Y, van Wersch R, Zhang Y. **2018**. Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **31**: 403–409.

Perronne, R., Rolland, B., Mabire, C., Enjalbert, J., Borg, J., Forst, E., *et al.* (2017). Evolution of adoption of variety mixtures and low-input multi-resistant bread wheat varieties since two decades in France: Increased use of these agroecological levers.

Pierik R, Mommer L, Voesenek LA. **2013**. Molecular mechanisms of plant competition: neighbour detection and response strategies (D Robinson, Ed.). *Functional Ecology* **27**: 841–853.

Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. **2014**. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 347–375.

Platt TG, Bever JD. **2009**. Kin competition and the evolution of cooperation. *Trends in Ecology & Evolution* **24**: 370–377.

Qi J, Song C-P, Wang B, Zhou J, Kangasjärvi J, Zhu J-K, Gong Z. **2018**. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. *Journal of Integrative Plant Biology* **60**: 805–826.

Qin A, Huang G, Chai Q, Yu A, Huang P. **2013**. Grain yield and soil respiratory response to intercropping systems on arid land. *Field Crops Research* **144**: 1–10.

Queller DC. **1994**. Genetic relatedness in viscous populations. *Evolutionary Ecology* **8**: 70–73.

Raboin LM, Ramanantsoanirina A, Dusserre J, Razasolofonanahary F, Tharreau D, Lannou C, Sester M. **2012**. Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. *Plant Pathology* **61**: 1103–1111.

Raj R, Pannu PPS. **2017**. MANAGEMENT OF RICE BLAST WITH DIFFERENT FUNGICIDES AND POTASSIUM SILICATE UNDER IN VITRO AND IN VIVO CONDITIONS. *Journal of Plant Pathology* **99**: 707–712.

Ramegowda V, Senthil-Kumar M. **2015**. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of Plant Physiology* **176**: 47–54.

Ratnieks FLW. **2015**. The Evolution of Genetic Odor-Cue Diversity in Social Hymenoptera. *The American Naturalist*.

Ravel S. **2020**. *sravel/LeAFtool*.

Ray DK, Ramankutty N, Mueller ND, West PC, Foley JA. **2012**. Recent patterns of crop yield growth and stagnation. *Nature Communications* **3**: 1293.

Reif JC, Zhang P, Dreisigacker S, Warburton ML, van Ginkel M, Hoisington D, Bohn M, Melchinger AE. **2005**. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 859–864.

Reiss ER, Drinkwater LE. **2018**. Cultivar mixtures: a meta-analysis of the effect of intraspecific diversity on crop yield. *Ecological Applications* **28**: 62–77.

Reiter J, Levina N, van der Linden M, Gruhlke M, Martin C, Slusarenko AJ. **2017**. Diallylthiosulfinate (Allicin), a Volatile Antimicrobial from Garlic (Allium sativum), Kills Human Lung Pathogenic Bacteria, Including MDR Strains, as a Vapor. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* **22**.

Rendueles O, Zee PC, Dinkelacker I, Amherd M, Wielgoss S, Velicer GJ. **2015**. Rapid and widespread de novo evolution of kin discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 9076–9081.

Rimbert H, Darrier B, Navarro J, Kitt J, Choulet F, Leveugle M, Duarte J, Rivière N, Eversole K, Le Gouis J, *et al.* 2018. High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLoS ONE* **13**: e0186329.

Robinson RA. **2007**. *Return to resistance: breeding crops to reduce pesticide dependence*. Fergus, Ont.: Sharebooks Pub.

Rodriguez-Saona CR, Frost CJ. **2010**. New evidence for a multi-functional role of herbivore-induced plant volatiles in defense against herbivores. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 58–60.

Rolfe SA, Griffiths J, Ton J. **2019**. Crying out for help with root exudates: adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Current Opinion in Microbiology* **49**: 73–82.

Saharan K, Schütz L, Kahmen A, Wiemken A, Boller T, Mathimaran N. **2018**. Finger Millet Growth and Nutrient Uptake Is Improved in Intercropping With Pigeon Pea Through "Biofertilization" and "Bioirrigation" Mediated by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Frontiers in Environmental Science* **6**.

Saijo Y, Loo EP. **2020**. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist* **225**: 87–104.

Sandroni M. **2020**. Plant resistance inducers (PRIs): perspectives for future disease management in the field. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **15**.

Sarayloo Z, Asemani D. **2015**. Designing a classifier for automatic detection of fungal diseases in wheat plant: By pattern recognition techniques. *2015 23rd Iranian Conference on Electrical Engineering*.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. **2019**. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* **3**: 430–439.

Schenke D, Utami HP, Zhou Z, Gallegos M-T, Cai D. **2019**. Suppression of UV-B stress induced flavonoids by biotic stress: Is there reciprocal crosstalk? *Plant physiology and biochemistry: PPB* **134**: 53–63.

Scheres B, van der Putten WH. **2017**. The plant perceptron connects environment to development. *Nature* **543**: 337–345.

Schmelz EA, Huffaker A, Sims JW, Christensen SA, Lu X, Okada K, Peters RJ. **2014**. Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins. *The Plant Journal* **79**: 659–678.

Schmid C, Bauer S, Müller B, Bartelheimer M. **2013**. Belowground neighbor perception in Arabidopsis thaliana studied by transcriptome analysis: roots of Hieracium pilosella cause biotic stress. *Frontiers in Plant Science* **4**.

Scholthof K-BG. **2007**. The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 152–156.

Seal AN, Pratley JE, Haig T, An M. **2004**. Identification and Quantitation of Compounds in a Series of Allelopathic and Non-Allelopathic Rice Root Exudates. *Journal of Chemical Ecology* **30**: 1647–1662.

Seifi HS, De Vleesschauwer D, Aziz A, Höfte M. **2014**. Modulating plant primary amino acid metabolism as a necrotrophic virulence strategy. *Plant Signaling & Behavior* **9**: e27995.

Seifi A, Visser RGF, Bai Y. **2013**. How to effectively deploy plant resistances to pests and pathogens in crop breeding. *Euphytica* **190**: 321–334.

Semchenko M, Saar S, Lepik A. **2014**. Plant root exudates mediate neighbour recognition and trigger complex behavioural changes. *New Phytologist* **204**: 631–637.

Serra Serra N, Shanmuganathan R, Becker C. **2021**. Allelopathy in rice: a story of momilactones, kin recognition, and weed management. *Journal of Experimental Botany* **72**: 4022–4037.

Shabala S. **2017**. *Plant Stress Physiology, 2nd Edition*. CABI.

Shahriar SA, Imtiaz AA, Hossain MB, Husna A, Eaty MNK. **2020**. Review: Rice Blast Disease. *Annual Research & Review in Biology*: 50–64.

Shameer K, Naika MBN, Shafi KM, Sowdhamini R. **2019**. Decoding systems biology of plant stress for sustainable agriculture development and optimized food production. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **145**: 19–39.

Sharifi R, Ryu C. **2021**. Social networking in crop plants: Wired and wireless cross-plant communications. *Plant, Cell & Environment* **44**: 1095–1110.

Shi J, Hu H, Zhang K, Zhang W, Yu Y, Wu Z, Wu P. **2014**. The paralogous SPX3 and SPX5 genes redundantly modulate Pi homeostasis in rice. *Journal of Experimental Botany* **65**: 859–870.

Silue D, Notteghem JL, Tharreau D. **1992**. Evidence of a gene-for-gene relationship in the Oryza sativa-Magnaporthe grisea pathosystem. *Phytopathology (USA)*.

Silva JC e, Potts BM, Bijma P, Kerr RJ, Pilbeam DJ. **2013**. Genetic control of interactions among individuals: contrasting outcomes of indirect genetic effects arising from neighbour disease infection and competition in a forest tree. *The New Phytologist* **197**: 631–641.

Sønderby IE, Geu-Flores F, Halkier BA. **2010**. Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* **15**: 283–290.

Stenberg JA. **2017**. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends in Plant Science* **22**: 759–769.

Subrahmaniam HJ, Libourel C, Journet E-P, Morel J-B, Muños S, Niebel A, Raffaele S, Roux F. **2018**. The genetics underlying natural variation of plant–plant interactions, a beloved but forgotten member of the family of biotic interactions. *The Plant Journal* **93**: 747–770.

Sukegawa S, Shiojiri K, Higami T, Suzuki S, Arimura G. **2018**. Pest management using mint volatiles to elicit resistance in soy: mechanism and application potential. *The Plant Journal* **96**: 910–920.

Sun Y, Wang M, Mur LAJ, Shen Q, Guo S. **2020**. Unravelling the Roles of Nitrogen Nutrition in Plant Disease Defences. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 572.

Sunder S, Singh R, Agarwal R. **2014**. Brown spot of rice: an overview. *Indian Phytopath* **Indian Phytopath.**: 201–215.

Takigahira H, Yamawo A. **2019**. Competitive responses based on kin-discrimination underlie variations in leaf functional traits in Japanese beech (Fagus crenata) seedlings. *Evolutionary Ecology* **33**: 521–531.

Thines M. **2014**. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. *European Journal of Plant Pathology* **138**: 431–447.

Tilman D. **1982**. *Resource Competition and Community Structure*. Princeton University Press.

Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. **2002**. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671–677.

Torices R, Gómez JM, Pannell JR. **2018**. Kin discrimination allows plants to modify investment towards pollinator attraction. *Nature Communications* **9**: 2018.

Tsuda K, Somssich IE. **2015**. Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* **206**: 932–947.

Underwood W. **2012**. The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science* **3**: 85.

Vannier N, Agler M, Hacquard S. **2019**. Microbiota-mediated disease resistance in plants. *PLOS Pathogens* **15**: e1007740.

Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY. **2018**. Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology* **28**: R619–R634.

Venturelli S, Belz RG, Kämper A, Berger A, Horn K von, Wegner A, Böcker A, Zabulon G, Langenecker T, Kohlbacher O, *et al.* 2015. Plants Release Precursors of Histone Deacetylase Inhibitors to Suppress Growth of Competitors. *The Plant Cell*: tpc.15.00585.

Vera Cruz CM, Bai J, Oña I, Leung H, Nelson RJ, Mew T-W, Leach JE. **2000**. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 13500–13505.

Vergne E, Ballini E, Droc G, Tharreau D, Nottéghem J-L, Morel J-B. **2008**. ARCHIPELAGO: A Dedicated Resource for Exploiting Past, Present, and Future Genomic Data on Disease Resistance Regulation in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **21**: 869–878.

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D, Nottéghem J-L, Morel J-B. **2010**. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen Magnaporthe oryzae. *BMC Plant Biology* **10**: 206.

Verly C, Djoman ACR, Rigault M, Giraud F, Rajjou L, Saint-Macary M-E, Dellagi A. **2020**. Plant Defense Stimulator Mediated Defense Activation Is Affected by Nitrate Fertilization and Developmental Stage in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science* **11**: 583.

Violle C, Garnier E, Lecoeur J, Roumet C, Podeur C, Blanchard A, Navas M-L. **2009**. Competition, traits and resource depletion in plant communities. *Oecologia* **160**: 747–755.

Volante A, Desiderio F, Tondelli A, Perrini R, Orasen G, Biselli C, Riccardi P, Vattari A, Cavalluzzo D, Urso S, *et al.* 2017. Genome-Wide Analysis of japonica Rice Performance under Limited Water and Permanent Flooding Conditions. *Frontiers in Plant Science* **8**.

Volkov AG, Toole S, WaMaina M. **2019**. Electrical signal transmission in the plant-wide web. *Bioelectrochemistry* **129**: 70–78.

Walker AP, Beckerman AP, Gu L, Kattge J, Cernusak LA, Domingues TF, Scales JC, Wohlfahrt G, Wullschleger SD, Woodward FI. **2014**. The relationship of leaf photosynthetic traits – Vcmax and Jmax – to leaf nitrogen, leaf phosphorus, and specific leaf area: a meta-analysis and modeling study. *Ecology and Evolution* **4**: 3218–3235.

Wang P, Kong CH, Hu F, Xu XH. **2007**. Allantoin involved in species interactions with rice and other organisms in paddy soil. *Plant and Soil* **296**: 43–51.

Wang J, Zhou L, Shi H, Chern M, Yu H, Yi H, He M, Yin J, Zhu X, Li Y, *et al.* 2018. A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice. : 4.

West SA, Griffin AS, Gardner A. **2007**. Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 415–432.

Wheeldon CD, Walker CH, Hamon-Josse M, Bennett T. **2021**. Wheat plants sense substrate volume and root density to proactively modulate shoot growth. *Plant, Cell & Environment* **44**: 1202–1214.

Wolfe MS. **1985**. The Current Status and Prospects of Multiline Cultivars and Variety Mixtures for Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 251–273.

Wu P, Shou H, Xu G, Lian X. **2013**. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 205–212.

Xiahong H, Yan S, Dong G, Fugang W, Lei P, Cunwu G, Ruzhi M, Yong X, Chengyun L, Youyong Z. **2011**. Comparison of Agronomic Traits between Rice Landraces and Modern Varieties at Different Altitudes in the Paddy Fields of Yuanyang Terrace, Yunnan Province. *Journal of Resources and Ecology* **2**: 46–50.

Xiao JZ, Tsuda M, Doke N, Nishimura S. **1991**. Phytotoxins produced by germinating spores of Bipolaris oryzae. *Phytopathology (USA)*.

Xie G, Yang B, Xu Z, Li F, Guo K, Zhang M, Wang L, Zou W, Wang Y, Peng L. **2013**. Global Identification of Multiple OsGH9 Family Members and Their Involvement in Cellulose Crystallinity Modification in Rice. *PLoS ONE* **8**: e50171.

Xu Y, Cheng H, Kong C, Meiners SJ. **2021**. Intra-specific kin recognition contributes to inter-specific allelopathy: A case study of allelopathic rice interference with paddy weeds. *Plant, Cell & Environment*: pce.14083.

Yang X-F, Kong C-H. **2017**. Interference of allelopathic rice with paddy weeds at the root level (B Hause, Ed.). *Plant Biology* **19**: 584–591.

Yang X-F, Li L-L, Xu Y, Kong C-H. **2018**. Kin recognition in rice (Oryza sativa) lines. *New Phytologist* **220**: 567–578.

Yang M, Zhang Y, Qi L, Mei X, Liao J, Ding X, Deng W, Fan L, He X, Vivanco JM, *et al.* 2014. Plant-Plant-Microbe Mechanisms Involved in Soil-Borne Disease Suppression on a Maize and Pepper Intercropping System (R Aroca, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e115052.

Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin X-F. **2021**. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102030.

Zeier J. **2013**. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell & Environment* **36**: 2085–2103.

Zeng W, Melotto M, He SY. **2010**. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 599–603.

Zhan J, Thrall PH, Burdon JJ. **2014**. Achieving sustainable plant disease management through evolutionary principles. *Trends in Plant Science* **19**: 570–575.

Zhou Z, Wang Z, Lv Q, Shi J, Zhong Y, Wu P, Mao C. **2015**. SPX proteins regulate Pi homeostasis and signaling in different subcellular level. *Plant Signaling & Behavior* **10**: e1061163.

Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Li Y, Chen J, Fan J, Yang S, Hu L, Leung H, *et al.* 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* **406**: 718–722.

Zhu S, Morel J-B. **2019**. Molecular mechanisms underlying microbial disease control in intercropping. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

Zhu Y-H, Weiner J, Li F-M. **2019**. Root proliferation in response to neighbouring roots in wheat (Triticum aestivum). *Basic and Applied Ecology* **39**: 10–14.

Zinsou VA, Djago GK, Tchemadon GC, Tovihoudji PG, Afouda LAC, Dossa HA, Soumaïla F. **2020**. Effect of different potassium rates on the severity of Northern Corn Leaf Blight caused by Helminthosporium turcicum in North Benin. : 9.

Zipfel C. **2009**. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 414–420.

Zipfel C, Oldroyd GED. **2017**. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**: 328–336.

Annexes

Annexe.1 Protocole d'extraction et de dosage des acides aminés.

Chromatographic conditions

Column: Waters AccQ-Tag Ultra C18 column (2.1 × 100mm, 1.7μm); UV detection wavelength: 260 nm; column temperature: 55ºC; elution gradient is shown in Table 1.

Table 1 Gradient elution

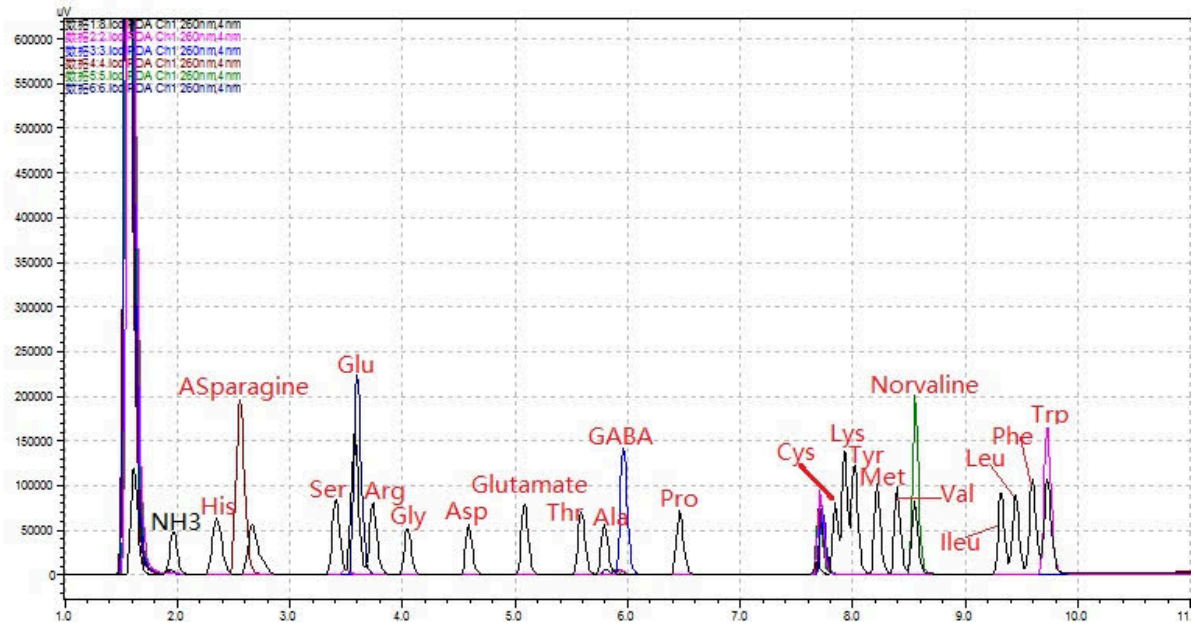
Time（min）	Flow rate （mL/min）	Eluent A（%） （V/V）	Eluent B（%） （V/V）
0.01	0.60	99.9	0.1
0.54	0.60	99.9	0.1
5.74	0.60	90.9	9.1
7.74	0.60	78.8	21.2
11.0	0.60	75.0	25.0
11.5	0.60	99.9	0.1
15	0.60	99.9	0.1

Eluent A: Take AccQ-Tag Ultra Eluent A 50 mL and add 950 mL of ultrapure water; Eluent B: AccQ-Tag Ultra Eluent B.

Table 2 Information of Amino Acid Standard

Amino acid	Mw	C(mol.L^{-1})	C(g.mL^{-1})	Amino Acid	Mw	C(mol.L^{-1})	C(g.mL^{-1})
Histidine	155.15	0.25	0.03879	Cystine	240.30	0.125	0.03004
Serine	105.09	0.25	0.02627	Lysine	146.19	0.25	0.03655
Arginine	174.20	0.25	0.04355	Tyrosine	181.19	0.25	0.04530
Glycine	75.067	0.25	0.01877	Methionine	149.21	0.25	0.03730
Aspartic acid	133.10	0.25	0.03328	Proline	117.15	0.25	0.02929
Glutamate	147.13	0.25	0.03678	Isoleucine	131.17	0.25	0.03279
Threonine	119.12	0.25	0.02978	Leucine	131.17	0.25	0.03279
Alanine	89.093	0.25	0.02227	Phenylalanine	165.19	0.25	0.04130
Valine	117.15	0.25	0.029	Tryptophan	204.23	0.25	0.0510
Glutamine	146.14	0.25	0.037	GABA	103.12	0.25	0.026

Asparagine	132.12	0.25	0.033	Norvaline	117.15	0.25	0.029



Reconstituting AccQ.Fluor Reagent

a. Preheat a heating block to 55ºC.

b. Tap Vial 2A lightly before opening to ensure all AccQ.Fluor Reagent Powder is at the bottom of the vial.

c. Rinse a clean micropipette by drawing and discarding 1 mL of AccQ.Fluor Reagent Diluent from Vial 2B.

d. Transfer 1.0 mL of AccQ.Fluor Reagent Diluent from Vial 2B to the AccQ.Fluor Reagent Power in Vial 2A.

e. Cap Vial 2A lightly and vortex for 10 seconds.

f. Heat Vial 2A on top of the heating block, vortex occasionally, until the powder dissolves (Up to 10min).

Derivatizing the mixture standard

Waters Amino Acid Standard (Waters,WAT088122) contains 17AA, and 5 single standard from Sigma (Glutamine, Asparagine, Tryptophan, γ-aminobutyric acid, Norvaline). The concentration is 2.5 mmol.L^{-1}.

a. Preheat a heating block to 55ºC.

b. Use a clean syringe to deliver 10 μL of 17AA and 5 single standards for each one to the bottom of a clean 2mL sample tube.

c. Use a micropipette to add 70 μL AccQ.Fluor Borate Buffer (Vial 1) to the 2mL sample tube. Vortex briefly.

d. Use a micropipette with a clean tip to add 20 μL of reconstituted AccQ.Fluor Reagent to the 2 mL sample tube. Vortex immediately for several seconds.

e. Allow to incubate for 1 minute at room temperature.

f. Heat the vial in a heating block for 10 minutes of 55ºC.

g. Use a micropipette with a clean tip to transfer the contents of the sample tube to the bottom of an autosampler vial limited volume insert (LVI). Cap with a silicone-lined septum.

h. Detect immediately or store the tube at 4ºC for the UPLC.

Sample preparation

a. Weigh 25-30 mg of sample to the Freezing Vials(JET BIOFIL, China) with 2 alumina beads.

b. Place the weighed sample in liquid nitrogen and then grind the sample into powder.

c. Add 250 μL of 80% ethanol, vortex, water bath at 80 ºC for 20 min, centrifuge at 14,000 rpm for 5 min, transfer the supernatant to a new clean tube.

d. Add 150 μL of 80% ethanol again, then do the step *c* again, transfer the supernatant to the same tube.

e. Do the step *c* again, transfer the supernatant to the same tube.

f. Mark all supernatants as “S”.

Derivatizing the samples

a. Take 200 μL of “S” to a clean tube.

b. Freeze-drying in a freeze dryer for 4h.

c. Add 200 μL H_2O_2, Sonicate for 15 min.

d. Filtration with 0.2 μm of filter membrane.

e. Take 10 μL sample to a clean tube. Add 10 uL of the Novaline solution

f. Use a micropipette to add 70 μL AccQ.Fluor Borate Buffer (Vial 1) to the tube. Vortex briefly.

g. Use a micropipette with a clean tip to add 20 µL of reconstituted AccQ.Fluor Reagent to the tube. Vortex immediately for several seconds.

h. Allow to incubate for 1 minute at room temperature.

i. Heat the vial in a heating block for 10 minutes of 55ºC.

j. Use a micropipette with a clean tip to transfer the contents of the sample tube to the bottom of an autosampler vial limited volume insert (LVI). Cap with a silicone-lined septum.

k. Detect immediately or store the tube at 4ºC for the UPLC.

Annexe.2 Tableaux supplémentaires chapitre 3.

Table S1. List of the 280 rice genotypes used in this study

Genotype name	Origin	Disease susceptibility mean (nbr lesions/surface)	Biomass mean (mg)
32UPLA	Argentina	5,14	1121,00
63UPLA	Argentina	10,20	1356,00
66UPLA	Argentina	12,36	1363,75
68AUPLA	Argentina	12,01	1094,50
75UPLA	Argentina	17,97	1480,67
77UPLA	Argentina	8,77	870,88
79UPLA	Argentina	8,31	1174,38
80UPLA	Argentina	16,88	1097,42
91UPLA	Argentina	8,01	1290,67
A201	USA	2,79	#N/A
ACHILLE	France	8,72	1003,00
ADAIR	USA	4,16	1135,15
AICHI ASAHI	Japan	4,91	1152,58
ALAN	France	9,66	903,08
ALBARON	France	14,21	1085,96
ALIANO C	France	12,18	1147,42
AMBRA	Italy	5,09	1319,25
ANTONI	Bulgaria	8,53	1037,17
ARBORIO	Italy	8,73	1219,38
ARELATE	France	2,31	1252,08
ARIETE	Italy	5,11	1422,38
ARIETE-QUILAMAPU-L203-D	France	13,99	1279,43
ARIETExALAN	France	7,31	1334,17
ARLESIENNE	France	10,53	931,17
ARLESIENNE x L 201	France	17,40	1260,58
AUGUSTO	Italy	13,53	1298,73
AURELIA	France	6,32	1419,25
AUZGUSTA	Romania	7,15	1035,57
BAGHLANI NANGARHAR	AFGHANISTAN	7,65	830,83
BAHIA	Spain	8,53	1257,92
BALILLA	Italy	9,94	999,00
BANAT2270	Romania	13,06	1095,58
BARCARIN	France	5,70	1525,75
BEIRAO	Portugal	13,09	#N/A
BELLE PATNA	France	8,32	1138,33
BENGAL	USA	5,82	1390,50
BETIS	Spain	4,32	1060,67

BLNK	Hungary	6,79	1067,75
BOMBA	Spain	9,15	729,38
BOMBILLA	Spain	8,40	942,42
BOND	France	13,58	1264,08
BONNI	Italy	8,06	1066,58
BORIBYEO	South Korea	3,34	1314,28
BORRACHO	Portugal	13,25	957,08
BRAVO	Italy	13,24	1106,33
BRIO	Italy	11,67	1309,00
CABAN	France	6,93	1383,50
CALENDAL	France	16,05	978,63
CAMPINO	Portugal	6,71	1103,37
CAPATAZ	Spain	14,73	1247,42
CARINA	Bulgaria	5,44	1207,30
CARIOCA	Brazil	3,63	747,13
CARRICO	France	2,96	1135,75
CENTAURO	Italy	15,55	1534,80
CENTURY PATNA	USA	17,76	922,38
CERNYJ	Russia	7,82	880,17
CHANG CH SANG HSU TAO	China	4,15	891,58
CHIANAN8	Taiwan	10,39	1173,58
CHIPKA	France	14,27	940,50
CHODONGJI	South Korea	13,02	1354,25
CIGALON	France	4,18	1321,00
CINIA257	Chile	16,66	1220,33
CINIA40	Chile	9,79	1235,42
CLOT	Spain	10,09	1045,13
COLINA	Spain	5,82	1058,97
COMORGAN	France	10,28	1005,38
CRESO	Italy	4,58	1348,00
CRLB1	Italy	10,09	1536,96
CT23	Chile	12,55	1174,83
CT58	Chile	6,00	906,92
DADAOTOU	China	10,04	1277,50
DELLMONT	USA	18,28	1397,33
DELLROSE	USA	7,13	1332,13
DELTA	France	6,14	811,48
DELTARIBEYxMIARA	France	9,05	#N/A
DIMITRA	France	15,96	1102,00
DIXIEBELL	France	2,34	1404,00
DOBONGBYEO	South Korea	21,26	1107,83
DORELLA	France	9,90	1334,50
DRAGO	Italy	10,23	1235,18

DRAGOxDONANA	France	6,12	1217,75
DRAGOxGUIXEL	France	7,07	1542,00
DREW	USA	4,86	1239,33
DUCATO	Italy	4,29	1123,05
E6V16	France	6,73	1288,63
E7V10	France	4,79	1045,08
ELLEBI	Italy	11,03	#N/A
ERCOLE	Italy	14,67	1083,63
EREVAN	Italy	11,17	1546,38
ESCARLATE	Portugal	9,28	1177,25
ESTRELA A IRRADIADO 874	France	6,73	1497,63
FAMILIA181	Portugal	7,70	1093,08
FLIPPER	Italy	8,89	#N/A
FRANCES	Spain	5,93	1533,48
FUKU BOZU	Japan	4,82	1298,38
GACHOLE	France	14,47	1505,00
GAGERON	France	10,26	883,00
GALLIS	Spain	11,78	1091,08
GEMJYA JYANAM	Bhutan	11,05	1321,38
GHIBLI	Italy	17,05	1194,58
GIADA	France	10,16	1296,58
GIGANTE VERCELLI	Italy	8,82	1130,67
GINES	France	8,21	1245,13
GITANO	Italy	16,59	1134,38
GIZA177	France	9,89	1039,25
GLADIO	Italy	7,24	1346,58
GOLFO	Italy	6,50	1346,61
GOOLARAH	Australia	9,23	1115,19
GRALDO	Italy	4,49	1349,50
GRITNA	Italy	11,15	1281,38
GUIXEL	France	2,90	1201,83
HAGINOMAE MOCHI	Japan	5,06	648,75
HAREM	Portugal	5,04	1212,75
HARRA	Australia	9,54	#N/A
HELENE	France	12,47	1684,13
HEUKGYEONG	South Korea	14,00	1321,67
HOKUSETSU	Japan	12,46	1105,33
HONDURAS	Italy	12,00	#N/A
HWINBE	South Korea	15,88	1090,38
IAC26	Brazil	14,69	1348,38
IAC32-52	France	13,14	1009,25
ISPANIKIA	Greece	2,54	1188,17
JACINTO	USA	15,47	1237,92
JEOCKMOSAEC	South Korea	9,56	1126,42

JO SANG DAE YA	Korea	11,12	1255,00
JUBELEINI	France	6,09	1286,13
K1952xTHAIBONNET	France	8,42	1408,77
KALAO	Brazil	5,48	1226,43
KALIN	Bulgaria	7,87	1132,17
KAMENO	Japan	10,72	1334,17
KEN CHIAO JU HSIAO LI	China	7,24	1246,50
KING	France	12,31	1405,58
KITAAKE	Japan	9,07	1312,47
KOPANCSI KEREK	Hungary	1,21	983,63
KORAL	Italy	5,18	1268,88
KOTOBUKI MOCHI	Japan	13,86	898,00
KRASNODAR424	Romania	11,19	1280,83
KRISTAL	Romania	11,86	953,63
KULON	Russia	7,97	1342,00
KYEEMA	France	10,30	1050,08
KYRMYZY	Uzbekistan	8,85	980,25
L202	USA	2,83	998,25
L204	USA	8,10	1194,08
L205	USA	6,87	994,50
LACASSINE	USA	6,58	1405,25
LAGRUE	USA	10,96	1225,00
LATSIBAVY-DANIELA	France	4,90	1414,50
LATSIDAHY	Madagascar	12,38	1244,50
LATSIKAB	Madagascar	6,60	1211,83
LEMONT	USA	4,66	1204,75
LIDO	Italy	5,92	1203,36
LOMELLINO	Italy	4,37	1141,75
LORD	France	5,04	1435,13
LOTO	Italy	7,08	1258,63
LUGANO40	Italy	9,43	1343,75
LUKTAKHAR	France	12,36	767,67
LUNA	USA	7,90	1108,83
LUSITO IRRADIADO 859	France	12,06	1124,92
LUXOR	Italy	4,94	1269,67
M202	USA	17,18	1364,31
M203	USA	9,70	1262,75
M204	USA	5,19	1220,33
MAIORAL	Portugal	16,12	1288,92
MANOBI	France	8,90	#N/A
MARATELLI	Italy	10,87	1203,56
MARENY	France	5,23	1246,98

MARTA	France	8,44	1317,75
MARTE	France	12,29	#N/A
MAYBELLE	France	10,51	976,92
MEJANES2	France	4,45	1341,25
MEJANES4	France	3,18	1459,71
MELAS	France	4,57	1163,38
MERIC	Turkey	10,90	869,33
MESTRE	Italy	19,41	1160,58
MIARA	Italy	6,94	#N/A
MILEV21	Bulgaria	17,84	1218,33
MISTRAL	France	4,59	1010,00
MIZO	South Korea	9,44	1250,67
MOWAEDO	South Korea	10,62	1043,13
MUGA	France	15,56	1114,08
N3	France	14,13	1613,38
NANGENG9	China	4,11	1000,33
NIPPONBARE	Japan	11,50	1432,88
NUNGYU151	Taiwan	8,17	1314,92
OCTET	France	12,41	1409,50
OLCENENGO	Italy	10,51	1117,92
OLTENITA	Romania	6,86	1077,92
OPALE	Italy	1,52	#N/A
OTA	Portugal	5,28	1106,25
PANDAxAGUIRRE	France	12,98	1218,13
PECOS	France	4,93	1119,53
PEGASO	France	10,40	1236,00
PEGONIL	Spain	4,78	843,63
PELDE	Australia	6,33	1037,17
PERLA	Portugal	13,11	1167,00
PIEMONTE	Italy	11,94	1208,88
PLOVDIV22	Bulgaria	7,95	755,25
PLOVDIV24	Bulgaria	5,15	1121,75
PLUS	France	17,09	#N/A
POLIZESTI28	Russia	6,02	1017,00
PRECOZ2FA	Argentina	13,02	976,00
PREVER	Italy	9,09	1500,08
PYGMALION-IRAT 122	France	8,12	944,88
PYGMALIONIRAT330 -G	France	10,83	1482,63
R215	France	15,05	1143,60
RECR	France	10,73	1357,08
REXMONT	USA	15,31	#N/A
RG106H70	France	8,21	#N/A
RG128H27	France	5,94	1257,88

RI113	France	12,88	1514,86
RI150	France	16,47	1075,75
RIBE253	Italy	4,14	1401,13
RINGO-MIARA	France	4,81	#N/A
RIZZOTTO51	Italy	10,45	968,08
RODINA	Bulgaria	13,75	1301,46
RONCOLO	Italy	5,24	1304,00
RONTUDUS	Hungary	8,17	902,00
ROVUMA	France	12,19	1361,80
ROXANI	France	5,28	1259,78
RPC12	China	8,27	1137,42
RUILLE	France	5,18	1212,08
RUSSO1	Portugal	11,27	1378,50
S101	USA	2,04	1374,75
S102	USA	4,75	#N/A
S102-2	USA	5,44	1336,92
SAEDIN	Bulgaria	9,15	1601,75
SAFARI	Portugal	14,68	858,42
SAGRES	Portugal	4,68	1375,75
SAKHA102	Egypt	6,64	1341,63
SAKHA103	Egypt	3,76	#N/A
SALOIO	Portugal	12,16	1225,33
SALVO	Italy	8,59	1180,50
SAMBA	Italy	6,61	#N/A
SAMBUC	France	5,77	912,33
SAN ANDREA	France	17,68	1437,00
SANDOCA	Portugal	9,75	1037,03
SANGHAI	France	6,59	#N/A
SATURNO	France	14,53	#N/A
SAVIO	Italy	6,58	1654,00
SCUDO	Italy	14,05	#N/A
SELENIO	Italy	6,25	989,69
SELN244A6	Australia	11,16	1243,50
SENIA	Spain	15,55	1422,50
SESIA	Italy	3,07	1301,55
SETTANTUNO	France	9,98	906,50
SHIRATAMA	Japan	9,08	838,90
SHSS381	France	9,48	1103,75
SHSS53	Spain	10,70	1228,88
SILLARIO	France	6,82	876,00
SIRBAL	France	11,99	#N/A
SLAVA	Bulgaria	4,31	#N/A
SMERALDO	France	13,54	1085,58
SOULANET	France	4,16	1410,23
SOURE	Portugal	9,53	1122,75

SOUSIXE	France	7,76	968,92
SPERANTA	Romania	8,99	#N/A
SPRINT	France	4,08	#N/A
SR113	Spain	12,22	1131,75
SSAL BYEO 2	South Korea	5,01	1360,13
SUPER	Portugal	6,79	965,08
SZARVASI70	Hungary	13,55	973,17
T757	France	16,45	1517,75
TAICHUNG65	Taiwan	6,54	1093,25
TAMARIN	France	5,57	1558,00
THAIPERLA	USA	17,85	1136,58
TIBER	France	6,94	1486,50
TIMICH108	France	12,68	1079,50
TOPAZIO	Italy	9,66	1013,25
TORIO	Portugal	5,12	#N/A
ULLAL	Spain	5,22	1142,75
VACCARES	France	6,40	1520,42
VALTEJO	Portugal	6,68	1065,75
VICTORIA	Argentina	7,16	1653,50
VIGUIERAT	France	6,27	1223,22
VL48xKULON	France	17,64	1135,50
VOLANO	Italy	5,92	994,38
YABANI MONTAKHAB 7	Egypt	11,39	843,67
YRL 196	Australia	13,29	1267,86
YRM6	Australia	14,51	1476,67
YU WEOL ZO	South Korea	13,62	1437,33
ZENA	Italy	6,65	1030,83

Table S2. List of the 42 rice genotypes used as validation set. Genotypes have been selected for their NMS1 haplotypes classification

Genotype	Haplotypes at NMS1	NMS phenotype on Kitaake
C21	NMS1-1	6,56
GOMA	NMS1-1	8,63
KOGONI91	NMS1-1	6,19
KOSHIHIKARI	NMS1-1	10,97
MEDUSA	NMS1-1	4,60
MINI	NMS1-1	12,41
MONTICELLI	NMS1-1	9,61
NANO	NMS1-1	4,15
OEIRAS	NMS1-1	8,84
RF162H026A	NMS1-1	8,14
S201	NMS1-1	8,16
SEQUIAL	NMS1-1	3,13
THIERNO BANDE	NMS1-1	5,85
VIRGO	NMS1-1	4,98
ALPE	NMS1-2	5,04
BARAGGIA	NMS1-2	6,23
CARNAROLI	NMS1-2	3,95
DOMSIAH	NMS1-2	5,55
FAISCA	NMS1-2	8,26
GLEVA	NMS1-2	8,54
IBO400	NMS1-2	6,24
JSENDRA	NMS1-2	12,65
RB132D	NMS1-2	15,52
RD111I	NMS1-2	9,14
RI135	NMS1-2	11,96
RIEGE	NMS1-2	15,17
RJ113I	NMS1-2	11,84
RL120H100	NMS1-2	10,98
RM114E	NMS1-2	11,87
ADRIANO	NMS1-3	8,25
APOLLO	NMS1-3	7,43
AYCHADE	NMS1-3	11,08
BRAZOS	NMS1-3	5,08
CIRAD423	NMS1-3	3,59
EUROSIS	NMS1-3	7,60
GANGE	NMS1-3	8,05
GAVELLA	NMS1-3	9,05
GIANO	NMS1-3	5,93
KETAN MENAH	NMS1-3	6,00
RE101J	NMS1-3	5,81

SIRIO	NMS1-3	4,61
TAMTAM	NMS1-3	9,94
VELA	NMS1-3	9,89

Table S3. List of the 92 genes, process targeted, reference and primers used in this study

Gene ID	Gene name	Expected response	Process	Forward primer	Reverse primer	Reference
LOC_Os01g40094	ABI2	Induced by exogenous ABA and high salinity	ABA	AGCACACTTCTTCGGTGTCT	ACAGACCCCTCTATCCTGCT	Lu et al, 2009
LOC_Os11g32110	ARF1	Up regulated after induction with auxin.	Auxin	ACCAGGTGCTACTGAATGGC	GAACAGAGTCTGGTTGCGGA	Waller et al, 2002
LOC_Os02g56700.1	CCR10	Up regulated undermethyl viologen treatment	Oxidative stress	CCAGTACCCCGTCACTTCAA	AAACCCAAATCCCTGAGCCT	Liu et al, 2010
LOC_Os02g08440.1	WRKY71	Expression induced by cold	Cold	GGCTTTCCGCAAGGTCAAA	GAGCCCCACCCGAGATTAAT	Kim et al, 2015
LOC_Os07g23570.1	CYP709C9	Up regulated under methyl viologen treatment	Oxidative stress	GTATTGGTTCGGAGCACAGC	GTGAGGGTTCGTCAGGTTCT	Liu et al, 2010
LOC_Os03g10620	D14-1	Up-regulated by strigolactone	Defense	ACTTCCACCATCCTGCTCTTCC	GCCGCCACGCACTCCTTG	Tomotsugu et al, 2009
LOC_Os04g0179200	MAS-1	Up regulated after inoculation by rice blast	Secondary metabolism	TCACCACAGCAGCTCACGAG	GCTTGGCCGCCGACTTGC	Yuan et al, 2008
LOC_Os04g09900.1	CPS4-1	Up regulated after inoculation by rice blast	Secondary metabolism	GTTTCAGGAGCCTCAGGGACAG	GACGACGCAGCCACGGATG	Hasegawa et al, 2011
LOC_Os09g26999.1	DEP1	Regulates tillering	Growth	GCCGCGAGATCACGTTCCT	ATCCAGAACGAGAAACGGGCT	Wang et Li, 2011
LOC_Os09g35010.1	DREB1B	Expression induced by cold	Cold	CAACGATGGCGACGAAGAAG	CATCCCGCCGAACCTGAA	Dubouzet et al, 2003
LOC_Os01g07120.1	DREB2A	Up-regulated under drought, high salt and freezing stresses	Drought	CTCCTCCTTTCATCGTGGCT	CGCTCCTGACAAACACGTTT	Dubouzet et al, 2003
LOC_Os03g08020	eEF-1α	Expression stable dans différentes conditions expérimentales	HKG	TTGTGCTGGATGAAGCTGATG	GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA	Jain et al, 2006
LOC_Os02g05330	eIF-4a	Expression stable dans différentes conditions expérimentales	HKG	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA	Jain et al, 2006
LOC_Os07g46460	Fd-GOGAT = OsGLU1	Involved in plant nitrogen uptake	Nitrogen	ATCGGATATGGTGCCAGTGC	GCATCTTCCCGTTTCGCATC	Yang et al, 2016
LOC_Os01g55940.1	GH3.2	Expression induced by drought, modulates endogenous IAA and ABA homeostasis	Auxin	AGCCTTCTACTACAACTACTACT	TGACACTGACACCGACTG	Du et al, 2012

LOC_Os03g50490	GLN1-3	Expression regulated by increase of nitrogen quantity	Nitrogen	GTTTGCCGGCATCAACATCAGC	GCCAGCAATCTCAGTGATCCTCTC	Fernandes et al, 2016
LOC_Os04g45970.1	Glut dehydr	Difference of expressionunder cold stress conditions	Cold, ABA, Drought	TTAGGCTTGGACACGGTTATTAAG	AACAACTTCTCCACCAACATTCTC	Rabbani et al, 2016
LOC_Os10g38470.1	GSTU24	Up regulated undermethyl viologen treatment	Oxidative stress	GGGAACAGTTTGTCCAAGGT	ACCCAGACGCCACTTGTACT	Liu et al, 2010
LOC_Os01g08320	IAA1	Up regulated after induction with auxin.	Auxin	ACCAAGAGCCGCTCAATGAG	ATCACACGTGGGCGAACATC	Song et al, 2009
LOC_Os01g18360.1	IAA4	Up regulated after induction with 50 µM auxin	Auxin	TCAACAAGTTCCTGGCCAGAA	CCCGTCCTGGTCTTCATAGG	Garg et al, 2012
LOC_Os08g39890	IPA1	Regulates tillering	HKG	TGCATTCCAAGGCTCCCCGC	TGCGGCAGCTGCGTTTTCCT	Wang et Li, 2011
LOC_Os11g01330	D53	Regulates tillering by repressing strigolactone biosynthesis	Defense	CGTGCGCGACCGGTAA	TGGCCCTTGCCGAACA	Hu et al, 2020
LOC_Os08g20420	MGD2	Up regulated upon longterm (21 days) Pi starvation in shoots	Primary metabolism	AGACAGGTTGCCAGATGGTT	CTGGAGCTTGTGGATGTCCT	Hasegawa et al, 2010
LOC_Os05g48200	NADH-GOGAT2	Involved in using nitrogenin senescent leaves	Nitrogen	AAGGCCCTTGAGGTAATACGTG	TTGTTAGCAACAGTCGCTTCGG	Secco et al, 2013
LOC_Os02g37830.1	Nek6	Involved in response to drought	Drought, ABA	TACCTTCCAGTGAAGCCCAC	TATCCACAGCTTGCTCTGCA	Tamura et al, 2011
LOC_Os08g36480	NIA1	Up-regulated by nitrogen	Nitrogen	ATGGCTCAAGCGCATCATCG	GTACCACCAAGCTTCGGCATTG	Ning et al, 2011
LOC_Os01g25484	NiR	Up-regulated by nitrogen	Nitrogen	CAAGCTCTCCAAGGAGGACATC	GCATCATGAACCGCCCATACTG	Ohwaki et al, 2005
LOC_Os01g46610.1	Os01g0654500	Similar to NADP-isocitrate dehydrogenase (wheat ortholog)	Primary metabolism	GTTCTCCACCGTGATGCAAC	TGGAGTAATCGTCGCACACT	Nishimura et al, 2005
LOC_Os02g10070.1	Os02g0194100	Similar to Citrate synthase (wheat ortholog)	Primary metabolism	TCCCCTTCTTCCTCCTCTCC	GCAAGCTGGCTTTGGAGAAT	Gayatri et al, 2018
LOC_Os02g38920.1	Os02g0601300= OsGAPC1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	Primary metabolism	CAACGAGGCACAAACCCTAG	GAGAGGAGTGCAAACGCAAA	Gayatri et al, 2018

LOC_Os02g50620.1	Os02g0739600	Similar to Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, mitochondrial precursor (wheat ortholog)	Primary metabolism	AAGCACTTACCGTACCAGGG	CGCAATGGCATCATCGACTT	Usman et al, 2020
LOC_Os04g40310.1	Os04g0479200	Similar to NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (wheat ortholog)	Primary metabolism	GTCTCCTCCCTCAACATGCA	TCCCTGATGACGACGATGTC	Guo et al, 2012
LOC_Os08g03290.1	Os08g0126300 = OsGAPC3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C3	Primary metabolism	AGACGCTTCTCTCCTCCTCT	CGATCCTTCCGAAACCGTTG	Zhang et al, 2011
LOC_Os09g14670.1	Os09g0315700 = PEPC	Phosphoenolpyruvate carboxylase (wheat ortholog)	Primary metabolism	CCAAGCTGCCTTTAGAACCG	CAATGCAGTATCCACACGGC	Pandey & Raina, 2020
LOC_Os04g43070.1	OsAMT1.1	Up regulated 12 hours after N deprivation	Nitrogen	AAGGGTGTGGTGGAATGGTG	AGAGGTAGAGCACTGCAGGA	Yang et al, 2015
LOC_Os05g39240.1	OsAMT2.1	Up regulated 12 hours after N deprivation	Nitrogen	TCTTCCAGTTCGAGTTCGCC	GACGGTGTAGGAGAGGAGGA	Yang et al, 2015
LOC_Os03g12500.1	OsAOS2	Up regulated under high carbon and low nitrogen balance	Primary metabolism	GCGATCAAGAAGGGGGAGAT	ACACGTATTGCAGCAGCTTC	Huang et al, 2016
LOC_Os05g03150	OsBLE1	Up-regulated undertreatment with brassinolid	Growth	GTACACCATCCCCCACAACA	CATGCCCAAGAGAACAGCAC	Yang et al, 2004
LOC_Os07g45570	OsBLE2	Expression induced by brassinolids	Growth	GCCAAAAAGAGGACACCCAC	GTCTCTGCCCTTGGTTACCA	Yang et al, 2003
LOC_Os10g28080.1	OsCHI	Up regulated from 6 to 48 hours after inoculation by *M. oryzae*	Defense	GGTGAACGGCTACTTGTTCC	CGAGGATGAAGTGGAAGCTG	Feng et al, 2011
LOC_Os01g10110.1	OsCKX2	Up-regulated under treatment with cytokinin (trans-zeatin)	Cytokinin	TGGCCGCATGTATGATTAGA	CATGCAAATTGGCTGGTAGT	Hirose et al, 2007
LOC_Os01g66360.1	OsCMS	Up regulated in rice leaves uppon JA, UV andCuCl2 treatment, also induced by chitin elicitor in suspension cells	Secondary metabolism	CTGTTCTTGGTGTGCCTGTG	GACCTCAAGTCCATCCCGTT	Okada et al, 2007
LOC_Os05g51690.1	OsCRCT	Up regulated after 4 to 24hours of sucrose and glucose treatment, supplemented with elevated CO2	Primary metabolism	TTCGGCTTCTCTGCTTACCC	GAGGATGTCAGGCGGGTC	Morita et al, 2015
LOC_Os04g35030	OsCSLH3	Down-regulation in nal1 mutants, NAL1 being involved in auxin transport	Growth	GCATCACCAGTGTTCATCCC	TAGCCCTCTCACAAATGGCA	Lin et al, 2019

LOC_Os02g44870	OsDHN1	Induced by drought	Drought	ATGAGAGGAACACGGAGAGC	GACAAGCTCCTCCTCATGCT	Lee et al, 2013
LOC_Os02g44108.1	OSEXPB11	Genes involved in cell wall assembly, down regulatedin LIC mutants, responsible for regulating rice plant architecture	Growth	CCAGGTCCAGTACAGAAGGG	CGAAGTAGAACGGGTTTGCC	Wang et al, 2008
LOC_Os10g40700.1	OSEXPB6	Genes involved in cell wall assembly, down regulatedin LIC mutants, responsible for regulating rice plant architecture	Growth	ACCCATTCTCGTCCATGACC	GCCACGGGGTAGTAGTTCAT	Wang et al, 2008
LOC_Os01g55240.1	OsGA2ox3	Up-regulated in OsDOG (dwarf) mutants	Growth	CCACCGTTAGCACAGAGGAT	CCTGTTGTCTCCAAGCCTTG	Liu et al, 2011
LOC_Os07g22930.2	OsGBSSII	Up regulated after 4 to 24hours of sucrose and glucose treatment, supplemented with elevated CO2	Primary metabolism	GGGAGGAGGTTCTTCTTGGG	AGGCACCGTCATGGAGAATT	Zhang et al, 2011
LOC_Os06g13830	OsGH9B9	Down-regulation in nal1 mutants, NAL1 being involved in auxin transport	Growth	CAATCCAACCCGCACTACTC	ACCTCCGCTATGCTACTGTC	Morita et al, 2015
LOC_Os03g49480	OsGNS1	Expression induced by inoculation (mutant approach)	Defense	CAGAGGGCTTGGCTTGCG	GCCTACCACAGCGTACCG	Lin et al, 2019
LOC_Os01g74300	OsHDR	Up regulated in rice leaves uppon JA, UV andCuCl2 treatment, also induced by chitin elicitor in suspension cells	Secondary metabolism	CTGATGGCTTGGTGAAGGTT	CAGCACATGCCGTAGTATGC	Nishizawa et al, 2003
LOC_Os02g39160	OsHDS	Up regulated in rice leaves uppon JA, UV andCuCl2 treatment, also induced by chitin elicitor in suspension cells	Secondary metabolism	TCTCGCACTCTGTCTCCATC	CTGGGTTAGGCAATCCTCGT	Atsushi et al, 2007
LOC_Os05g45590.1	OsHXK2	Up regulated in excised leaves treated with sucrose and fructose	Primary metabolism	ATAGGGACATTGGCTGGTGG	CCTGAAGTTCCCCCATTCCA	Atsushi et al, 2007
LOC_Os05g44760.1	OsHXK5	Up regulated in excised leaves treated with sucrose and fructose	Primary metabolism	GCACTGGTACAAATGCAGCA	AAGCTCCCCCATTCTGTGTT	Cho, et al 2006
LOC_Os01g53930.1	OsHXK6	Up regulated in excised leaves treated with sucrose and fructose	Primary metabolism	TCCACCTCACCTGATGGTTG	ATCCTCTCCCTCGGTCTTGA	Cho, et al 2006

LOC_Os03g08320.1	OsJAZ11	Down regulated 0.5 hoursafter treatment with jasmonic acid and up regulated after 2 hours	Jasmonic acid	TGCAGAGGTTCCTGGAGAAG	CCATCGTCTTTCTTGGCACG	Cho, et al 2006
LOC_Os08g33160.1	OsJAZ3	Expression strongly induced by drought	Drought	TGCTGCGAAACTTACAGTGC	CTTGGGGAGAGTCACAGCTT	Ye et al 2009
LOC_Os04g32480.1	OsJAZ5	Up regulated expressionunder jasmonic acid treatment	Jasmonic acid	AAAGCAAAAGGACTCGCTCG	CCAAGCTGGTCAACCTCTCT	Ye et al 2009
LOC_Os03g28940.1	OsJAZ6	Up regulated expressionunder jasmonic acid treatment	Jasmonic acid	TCCATCTTCCGCTACTGCAA	CAGCAGCATTTGGACGAACA	Ye et al 2009
LOC_Os04g10060.1	OsKS4	Up regulated in rice leaves uppon JA, UV andCuCl2 treatment, also induced by chitin elicitor in suspension cells	Secondary metabolism	CTATGGAAGCTGTAGCCCGT	GACGCATTCCTCCGTTATGC	Ye et al 2009
LOC_Os08g39840	OsLIPOxy	Up regulated undermethyl viologen treatment	Oxidative stress	TACCAGCTGATGAAGCCCTT	TGGAGCGTTTTGTCTCATCA	Atsushi et al, 2007
LOC_Os01g74300	OsMT2b	Down-regulated by cytokinins and inoculation	Defense	ACCGTCGTCGTCGTTGTCAG	GCATGAGGAGATGGAGCAGGAG	Wong et al, 2004
LOC_Os01g74300	OsNOMT	Up regulated in two weeks old seedlings leaves after inoculation by blast rice fungus	Secondary metabolism	GCACGTCCTTGTTCCAGTAC	CTTGTTGGTGATGACGACGG	Hasegawa et al, 2014
LOC_Os01g09800	OsNPR1	Expression induced by inoculation and salicylic acid	Defense	CCTGATGGTTGCCTTCTGTC	ATTCAAGCACTTGTATTACACCTC	Yuan et al, 2007
LOC_Os05g35290.1	OsPAL	Up regulated from 6 to 48 hours after inoculation by *M. oryzae*	Defense	TTTGGGTGGAAGCGATGGTAG	GCTATGTTTGCGTGTTCTTGGC	Feng, et al 2011
LOC_Os08g17784.1	OsPAP23	Up regulated upon longterm (21 days) Pi starvation in shoots	Primary metabolism	GACTCTGGTTGGTTGTGTGC	GCATCAGCGTGTTCATGGAA	Secco et al, 2013
LOC_Os02g56910.1	OsPSAT	Up regulated in leaves after drought treatment	Secondary metabolism	TTAATCCCCTCACACCCTGG	GGTTTTCCACTCGGTGCAAA	SujithKumar et al, 2018
LOC_Os06g08440.1	OsRR22	Up-regulated in response to cytokinin	Cytokinin	GGCAACCTCAGCTTCAACAG	TGGTGGCAATGAACTGCTTG	Raines et al 2016
LOC_Os10g25310	OsSPX3	Up regulated upon longterm (21 days) Pi starvation in shoots	Primary metabolism	CAGTCCATCCGATCCGATCC	TCTCTCAATGACTCGTTTCGT	Secco et al, 2013
LOC_Os03g47970.1	OsTIFY1a	Expression strongly induced by drought	Drought	CTGCCAAAAGGGTTGCTTCA	CTCTTCCGGCAAATTGACCC	Ye et al 2009
LOC_Os03g52450.1	OsTIFY1b	Expression strongly induced by drought	Drought	CCCAAAATGACTGTGCAGCA	CTCTGGCACCATCTCAGTGT	Ye et al 2009

LOC_Os04g27790	OsTP24	Up regulated 24 to 48 hours after jasmonic acid treatment	Secondary metabolism	GGTAGTGCAACGAGTTGTGAA	TGACAATACAGTCTAAAAGGGGAA	Kayo et al, 2016
LOC_Os08g13920	OsXTH17	Down-regulation in nal1 mutants, NAL1 being involved in auxin transport	Growth	GCCGACTTCCACACCTACAA	GCCAGGTCGTCGTACTTCTT	Lin et al, 2019
LOC_Os11g33270.1	OsXTR1	Up-regulated in the internod tissues under treatment with brassinolids and gibberellin	Growth	CCACCAAGGACTACCACTCC	AGTAGAGCTTCATCGGCTGG	Uozu et al, 2000
LOC_Os03g44710.1	OsYABBY2	Down-regulation in nal1 mutants, NAL1 being involved in auxin transport	Growth	CACTGCAACTTCTGCAACAC	GCCATATCTGGAAGATGAGCC	Dan Jiang et al 2015
LOC_Os12g42610.1	OsYABBY6	Down-regulation in nal1 mutants, NAL1 being involved in auxin transport	Growth	TTCGTCGTCTTCCAAGCTCA	ACCCTTTGCCTCTTCTCTGG	Dan Jiang et al 2015
LOC_Os12g36880.1	PBZ1	Up-regulated in response to inoculation	Defense	AGGCATCAGTGGTCAGTAGAG	CGGGTCTTGTATGTGCTTCC	Delteil et al, 2012
Os07g48020	POX223	Up-regulated in response to inoculation	Defense	CTCAGCTGCTCCAAGGTGAA	TGTGGCCCGTTTATGTCGTC	Vergne et al, 2006
Os01g28450	PR1b	Induced by inoculation and ethylene treatment	Defense	GGGCGTACGTACTGGCTAG	GTGAAGGCGTGGATCAGACA	Agrawal et al, 2001
LOC_Os12g43430.1	PR5	Up-regulated in response to inoculation	Defense	AGCCAGGACTTCTACGACCT	GCGTGTGTCTTGGTGTTGTC	Delteil et al, 2012
LOC_Os01g73200.1	PRX22	Up-regulated by ethylene treatment	Ethylene	TTCTTCAACGCAACCACCAA	TCGATCATGCCCATCTTGAC	Garg, et al 2012
LOC_Os01g03390.1	RBBI2	Up-regulated in response to inoculation	Defense	GTGTGTTGTCTCGTGTGAACG	TACGATGACAGCGCAACATG	Delteil et al, 2012
LOC_Os10g25030	RCCR1	Up regulation after induction with ABA.	ABA	CGCATTTCCTCATGGAATTT	CTTCTCACGCTGTTTGTCCA	Liang et al, 2014
LOC_Os12g04500.1	RR10	Expression induced by cytokinin	Cytokinin	CTCAAACCAGTTCGGCTCTC	TGTTGCTTTGCAGGTGTTGT	Yukihiro, 2006
LOC_Os09g36200	SGR	Up regulation after induction with ABA.	ABA	AGGGGTGGTACAACAAGCTG	GCTCCTTGCGGAAGATGTAG	Liang et al, 2014
LOC_Os05g45410.1	SPL7	Modification of expression depending on time after inoculation. Mostly up-regulated but down-regulated after 96h	Defense	CGGATTAGAGGCTTGCGTGTTAC	GCACAGTAGTCAGCGGATAGAAC	Delteil et al, 2012
LOC_Os02g10780	SPX2	Up regulated upon longterm (21 days) Pi starvation in shoots	Primary metabolism	TCACCACCGACCTCCTCTAC	GGCTTTGAACCCTTCTCCTC	Secco et al, 2013
LOC_Os01g22490	UBQ5	Stable expression under various exprimental conditions	HKG	CACCTACGTCTACAACCAGCAG	TCATCTAATAACCAGTTCGATTTCC	Jain et al, 2006

LOC_Os01g08710	WRKY102	Expression only induced by cold stress condition	Cold	GGATGAAGAAGGTTGGGGGA	GTCGCTCATCGTCTTGAAGC	Ramamoorthy et al, 2008
LOC_Os12g02400	WRKY114	Up-regulated under drought stress conditions, as well as treatment with MeJA and SA	Drought	GTCGCTGGAAAGGCAAGAAG	TCATGAGGGACGACTGTGTG	Ramamoorthy etal, 2008
LOC_Os05g25770	WRKY45	Up regulated in response to treatment with SA	Salicylic acid	ACGACGAGGTTGTCTTCGATCTG	GCCCGTGTCCATCCATGATTCTTC	Shimono et al, 2007
LOC_Os05g46020	WRKY7	Up-regulated under drought and high salt conditions	Drought	GCGCGTACGGTTAATTTGAT	ACGGGACAGAGATCGAGAGA	Ramamoorthy etal, 2008
LOC_Os12g01360	D53like-1	Regulates tillering by repressing strigolactone biosynthesis	Defense	GGCAACGTCGCAGGCATCAC	CGCCGCAGTATTGACCGAACC	Hu et al, 2020
LOC_Os05g14370.1	WRKY82	Up regulated under treatment with SA	Salicylic acid	GGATTGCTCCAGGAAGGTGA	TGCCCTCACTGTTCTTCCTC	Garg, et al 2012

Table S4. Total gene list present in the NMS1 QTL

GeneID	Gene Name	Gene Length	Function Orygenesdb
Os03g28940		1276	ZIM domain containing protein, putative, expressed
Os03g28960		2400	DNA-directed RNA polymerase subunit, putative, expressed
Os03g28980		2622	WD40-like Beta Propeller Repeat family protein, expressed
Os03g28990		1933	zinc finger family protein, putative, expressed
Os03g29020		2766	transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class
Os03g29110		660	retrotransposon protein, putative, unclassified
Os03g29130		3723	retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass, expressed
Os03g29150		1239	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein, putative, expressed
Os03g29170		2252	sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating, putative, expressed
Os03g29180		1403	ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial precursor, putative, expressed
Os03g29184		774	expressed protein
Os03g29190		2198	PDI, putative, expressed
Os03g29194		492	expressed protein
Os03g29200		675	retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed
Os03g29212		1554	retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass
Os03g29230		342	retrotransposon protein, putative, unclassified
Os03g29240		2093	PDI, putative, expressed
Os03g29244		324	expressed protein
Os03g29250	OsSPX5	1018	SPX domain-containing protein, putative, expressed
Os03g29260	EF-1beta2	1717	elongation factor protein, putative, expressed
Os03g29270		1068	expressed protein
Os03g29340		3756	domain of unknown function domain containing protein, expressed
Os03g29350		2984	von Willebrand factor type A domain containing protein, expressed
Os03g29360		513	expressed protein
Os03g29389		324	hypothetical protein
Os03g29410		1879	tyrosine protein kinase domain containing protein, putative, expressed
Os03g29430		1290	retrotransposon protein, putative, unclassified
Os03g29460		791	60S ribosomal protein, putative, expressed
Os03g29470		1270	transcription initiation factor IID, putative, expressed
Os03g29480	OsNSP1	1572	nodulation-signaling pathway 1 protein, putative, expressed
Os03g29510		300	retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass
Os03g29540		4133	ATP-dependent protease, putative, expressed
Os03g29570		654	mps one binder kinase activator-like 1A, putative, expressed
Os03g29584		1206	expressed protein
Os03g29630	OsELS2	1194	ulp1 protease family protein, putative, expressed
Os03g29650		4980	retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass, expressed
Os03g29680		1349	EARLY flowering protein, putative, expressed
Os03g29710		852	hypothetical protein

Table S5. Gene list and function present in the NMS1 QTL two intervals Gene functions, expression and localization fromFunRiceGenes and rice Xpro and rice database.

Table S5. Gene list and function present in the NMS1 QTL two intervals Gene functions, expression and localization fromFunRiceGenes and rice Xpro and rice database.

Intervals	GeneID	Gene Name	Gene Length	Function Orygenesdb	Rice xpro database	Bibliography information	Reference
1	Os03g28940	OsJAZ6	1276	ZIM domain containing protein, putative, expressed	No information	Response to biotic and abiotic stress and jasmonic acid	Ye et al. 2009
	Os03g28960		2400	DNA-directed RNA polymerase subunit, putative, expressed	No information	No information	
	Os03g28980		2622	WD40-like Beta Propeller Repeat family protein, expressed	Expressed in inflorescence	No information	
	Os03g28990		1933	zinc finger family protein, putative, expressed	Expressed in inflorescence	Regulator for abiotic stress response in rice	Cho et al 2017
2	Os03g29180		1403	ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial precursor, putative, expressed	No information	No information	
	Os03g29184		774	expressed protein	No information	No information	
	Os03g29190		2198	PDI, putative, expressed	No information	Change conformation of protein	Wilkinson et al. 2004
	Os03g29194		492	expressed protein	No information	No information	
	Os03g29200		675	retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	Not detected	No information	
	Os03g29212		1554	retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass	Not detected	No information	
	Os03g29230		342	retrotransposon protein, putative, unclassified	Not detected	No information	
	Os03g29240	OsPDIL	2093	PDI, putative, expressed	Expressed in roots	Change conformation of protein, implicated in Endoplasmic reticulum stress and abiotic response in rice	Qian et al. 2015
	Os03g29244		324	expressed protein	No information	No information	
	Os03g29250	OsSPX5	1018	SPX domain-containing protein, putative, expressed	Expressed in roots and leaf	Implicated in Pi homeostasis and signaling in rice	Zhou et al 2015 / Shi et al. 2013
	Os03g29260	EF-1beta2	1717	elongation factor protein, putative, expressed	No information	No information	
	Os03g29270		1068	expressed protein	Not detected	No information	

Table S5. Gene list and function present Table S6. List of the 13 genotypes used for the fluidigm gene expression analysi

Table S6. List of the 13 genotypes used for the fluidigm gene expression analysis

Genotype name	Origin	Disease susceptibility mean	Biomass mean	Haplotype	NMS phenotype
KITAAKE	Japan	9,07	1312,47	1	control
75UPLA	Argentina	17,97	1480,67	1	Negative
CENTURY PATNA	USA	17,76	922,38	2	Negative
GITANO	Italy	16,59	1134,38	2	Negative
GAGERON	France	10,26	883,00	1	Neutral
KULON	Russia	7,97	1342,00	2	Neutral
NIPPONBARE	Japan	11,50	1432,88	2	Neutral
32UPLA	Argentina	5,14	1121,00	2	Positive
DIXIEBELL	France	2,34	1404,00	2	Positive
GUIXEL	France	2,90	1201,83	2	Positive
L202	USA	2,83	998,25	2	Positive
LIDO	Italy	5,92	1203,36	2	Positive
SESIA	Italy	3,07	1301,55	2	Positive

Résumé

Depuis les années 2000, les mélanges variétaux connaissent un regain d'intérêt en agriculture. Mélanger des génotypes d'une même espèce est à l'origine d'une augmentation de la production, d'une réduction des intrants chimiques et d'une amélioration de la durabilité de nos systèmes agricoles. De plus, ces mélanges de variétés permettent une meilleure gestion des maladies en permettant notamment de réduire la dispersion des agents pathogènes. Outre ces effets d'ordre épidémiologiques, nous avons fait l'hypothèse que des interactions plante-plante intra-spécifiques peuvent aussi modifier la sensibilité des plantes aux agents pathogènes dans les mélanges variétaux. Pour tester cette hypothèse, des mélanges de génotypes de riz ou de blé dur ont été inoculés manuellement dans des conditions contrôlées, en l'absence de propagation des agents pathogènes. Dans un premier temps, en inoculant plus de 400 mélanges binaires de riz ou de blé avec des agents pathogènes foliaires majeurs, nous avons pu quantifier la fréquence et le niveau des modifications de sensibilité déclenchées dans une plante focale en présence d'un voisin différent, mais de la même espèce. Ces modifications dues aux interactions plante-plante sont parfois du même ordre de grandeur que les différences pouvant exister entre variétés. Par la suite et ce dans chaque espèce, les mécanismes sous-jacents à ces modifications ont été analysées plus précisément en se focalisant sur un couple de génotypes. Nous avons ainsi montré qu'une interaction dans le sol entre des plantes voisines de la même espèce peut modifier la sensibilité des plantes à différents agents pathogènes ainsi que leur immunité, et ce de manière constitutive. Cette modulation de la sensibilité de la plante focale ne nécessite pas que le voisin soit lui-même malade. Ces analyses ont été complétées par des analyses transcriptomiques montrant que différents voisinages produisent des modifications caractéristiques dans la plante focale. Enfin, nous avons étudié les déterminants génétiques du déclenchement par la plante voisine de la modulation de la sensibilité dans la plante focale en menant une expérience de génétique d'association. Cette analyse a permis de mettre en évidence un locus, dans le génotype voisin, qui conditionne ce déclenchement. Ensemble, nos résultats montrent donc que la réduction des maladies dans les mélanges variétaux pourrait également résulter d'interactions directes entre plantes, en plus des mécanismes affectant la propagation des agents pathogènes à l'échelle du champ. La mise en évidence de ce phénomène, appelé 'Neighbour-Modulated Susceptibility' (NMS), pourrait permettre de fournir de nouvelles façons de concevoir et surtout d'optimiser les mélanges variétaux.

Abstract

Since the last decade, varietal mixtures have been gaining interest in agriculture. Mixing genotypes of the same species is at the origin of an increase in production, a reduction of chemical inputs and an improvement of the sustainability of our agricultural system. Moreover, varietal mixtures allow a better management of diseases by reducing the dispersion of pathogens. In addition to these epidemiological effects, we hypothesized that intra-specific plant-plant interactions may also modify the susceptibility of plants to pathogens in varietal mixtures. To test this hypothesis, mixtures of rice or durum wheat genotypes were manually inoculated under controlled conditions, in the absence of pathogen propagation. First, by inoculating more than 400 binary mixtures of rice or wheat with major foliar pathogens, we were able to quantify the frequency and level of susceptibility modification triggered in a focal plant in the presence of a different neighbor, but of the same species. These changes due to plant-plant interactions are sometimes of the same order of magnitude as the differences that can exist between varieties. The mechanisms underlying these modifications were then analyzed more precisely in each species by focusing on a pair of genotypes. We have shown that an interaction in the soil between neighbouring plants of the same species can constitutively modify the susceptibility of the plants to different pathogens as well as their immunity. This modulation of the susceptibility of the focal plant does not require that the neighbor was previously inoculated. These analyses were complemented by transcriptomic analyses showing that different neighbors produce characteristic pattern of mofication in the focal plant. Finally, we studied the genetic determinants of the neighbor's triggering of susceptibility modulation in the focal plant by conducting an association genetics experiment. This analysis revealed a locus in the neighboring genotype that conditions this triggering. Together, our results show that disease reduction in varietal mixtures could also result from direct interactions between plants, in addition to mechanisms affecting pathogen spread at the field level. The identification of this phenomenon, called 'Neighbour-Modulated Susceptibility' (NMS), could provide new ways to design and especially to optimize varietal mixtures.