



HAL
open science

Protection du blé contre l'oïdium par des champignons mycorhiziens à arbuscules : mécanismes et optimisation

Ghalia Mustafa

► **To cite this version:**

Ghalia Mustafa. Protection du blé contre l'oïdium par des champignons mycorhiziens à arbuscules : mécanismes et optimisation. Phytopathologie et phytopharmacie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2015. Français. NNT : 2015DUNK0388 . tel-01451353

HAL Id: tel-01451353

<https://theses.hal.science/tel-01451353>

Submitted on 1 Feb 2017

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

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



THESE DE L'UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement
Ingénierie des Fonctions Biologiques
Mention: Phytopathologie

Protection du blé contre l'oïdium par des champignons mycorhiziens à arbuscules: mécanismes et optimisation

Par

Ghalia MUSTAFA

Soutenue le 10 septembre 2015 devant le jury:

Pr Stephan DECLERCK	Université Catholique de Louvain-La-Neuve	Rapporteur
Pr Essaïd AÏT BARKA	Université de Reims Champagne-Ardenne	Rapporteur
Pr Jean-Louis HILBERT	Université de Lille	Examineur
Dr Pascale MAILLOT	Université de Haute Alsace	Examineur
Pr Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI	Université du Littoral Côte d'Opale	Directrice de thèse
Pr Philippe REIGNAULT	Université du Littoral Côte d'Opale	Co-directeur de thèse

*Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEiV), Calais
50, rue Ferdinand Buisson, BP 669 - 62228 Calais cedex*

THESE DE L'UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement
Ingénierie des Fonctions Biologiques
Mention: Phytopathologie

Protection du blé contre l'oïdium par des champignons mycorhiziens à arbuscules: mécanismes et optimisation

Par

Ghalia MUSTAFA

Soutenue le 10 septembre 2015 devant le jury:

Pr Stephan DECLERCK	Université Catholique de Louvain-La-Neuve	Rapporteur
Pr Essäïd AÏT BARKA	Université de Reims Champagne-Ardenne	Rapporteur
Pr Jean-Louis HILBERT	Université de Lille	Examineur
Dr Pascale MAILLOT	Université de Haute Alsace	Examineur
Pr Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI	Université du Littoral Côte d'Opale	Directrice de thèse
Pr Philippe REIGNAULT	Université du Littoral Côte d'Opale	Co-directeur de thèse

*Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Calais
50, rue Ferdinand Buisson, BP 669 - 62228 Calais cedex*

Remerciements

Gloire à « ALLAH » le tout puissant et le miséricordieux, qui a exaucé mon rêve et m'a donnée force et patience pour accomplir ce modeste travail.

Cette thèse de Doctorat a été effectuée au sein de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) dans l'Equipe Interactions Plantes-Champignons et Remédiation (IPCR) à l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULLCO) avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur Syrien.

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne...

Je commence par une pensée pour Monsieur Pirouz Shirali, éternel Directeur de l'UCEIV, qui était à l'écoute des étudiants. Je remercie également Monsieur Dominique Courcot, Directeur actuel de l'UCEIV, pour vos encouragements et votre bonté de cœur.

Je tiens à remercier spécialement ma directrice de thèse, madame Anissa Lounès-Hadj Sahraoui, Professeure à l'ULLCO d'avoir assuré la direction et l'encadrement de mes travaux de thèse. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je tiens à remercier également mon co-directeur de thèse, monsieur Philippe Reignault, Professeur à l'ULLCO. Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités. Je me souviendrai de votre compréhension et votre efficacité. Mes sincères remerciements pour tout.

Je remercie également monsieur Stephan Declerck, Professeur à l'Université Catholique de Louvain-La-Neuve et monsieur Essaïd Aït Barka, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Que, monsieur Jean-Louis Hilbert, Professeur à l'université de Lille 1 et madame Pascale Maillot, Maître de Conférences HDR à l'Université de Haute

Alsace, trouvent ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de participer à ce jury.

Un grand merci à madame Beatrice Randoux, Maître de conférences à l'ULLCO et co-encadrante de ma thèse, pour ses remarques pertinentes et ses précieux conseils qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.

Mes remerciements vont également à Joël Fontaine, Maître de conférences-HDR à l'ULLCO et co-encadrant de cette thèse. J'ai apprécié vos précieux conseils tout au long de la thèse.

Merci à Maryline Magnin-Robert, Maître de conférences à l'ULLCO, pour son aide dans l'analyse des résultats de biologie moléculaire et la rédaction.

Un très grand merci, tout particulier, à Benoît Tisserant, Ingénieur de Recherche à l'UCEIV, pour tout ce qu'il m'a appris depuis mon Master 2 et pour nos innombrables et inoubliables conversations sur la mycorhization!

Merci à Frédéric Laruelle, Ingénieur de Recherche et Natacha Bourdon, Technicienne à l'UCEIV pour leur aide.

Un très grand merci à mon meilleur ami, Hacène pour nos innombrables moments avec mes meilleurs souhaits de réussite pour sa vie professionnelle et personnelle. Un grand merci aussi pour mes amies Sonia, Karima, Ingrid, Maryline, Maréva, Giang, Sherine et Nesreen pour leur aide et leur soutien, avec mes sincères vœux de réussite.

Je souhaite également remercier Corinne et Sandrine qui étaient toujours à mes côtés.

Mon cœur vous remercie beaucoup Mme Landry, Razan, Feras et les enfants Dania, Abdulrahman et Rayan. Vous êtes ma famille ici en France et l'oreille attentive de tous les problèmes que j'ai affrontés.

Un autre merci aux personnes qui m'ont fait mal et grâce à eux je suis encore là pour réussir ma vie et ma thèse.

الشكر الأعظم لك ملاكي، صديقتي، حبيبتي أُمي. لقد كنت دائما إلى جانبي وشاركتني همومي
وإن فصل بيننا درج طويل.

أبي العزيز يا من أعطاني الثقة وأعدك أنني لن أخونها أبداً. كم تمنيت أن تكونوا في هذه
اللحظة إلى جانبي، شكرا لدعمكم ومحبتكم.

علي، عمر، عبد الإله وحنفران: إخوتي الأعماء شكرا لمشاعركم الجياشة نحوني وحنوكم علي، لقد
تحمّلت الصعاب ببعدي عنكم لكي أصل إلى ما وصلت إليه.

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii

Sommair

Introduction générale – Objectifs	1
<i>Partie 1: Synthèse bibliographique</i>	
<u>I. Le pathosystème étudié: blé/oïdium</u>	
<i>1: Le blé</i>	
I. Généralités	5
II. Caractéristiques biologiques	5
<u>II. 1. Morphologie de la plante</u>	5
<u>II. 2. Evolution du grain: germination et développement d'une plante</u>	6
<i>2. L'oïdium du Blé</i>	
I. Symptômes et cycle de développement du pathogène	9
II. Mécanisme d'infection par <i>Bgt</i>	10
<u>II. 1. La germination des conidies</u>	10
<u>II. 2. La formation du tube germinatif primaire (TGP)</u>	11
<u>II. 3. Le tube germinatif appressorial (TGA)</u>	11
<u>II. 4. L'haustorium</u>	12
III. Conditions favorables au développement de la maladie	13
IV. Moyens de lutte contre l'oïdium	14
<u>IV. 1. La lutte génétique</u>	14
<u>IV. 2. Mise en œuvre des pratiques culturales</u>	15
<u>IV. 3. La lutte chimique</u>	15
<u>IV. 4. Les stimulateurs de défense des plantes</u>	16
<u>II. L'agent de biocontrôle: Les Champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)</u>	
I. Généralités	17
II. Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules	17
III. Cycle de développement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire	18
III. 1. Phase asymbiotique: germination de la spore et ramification de l'hyphes germinative	19
III. 2. Phase pré-symbiotique: Le dialogue entre une plante et un champignon mycorhizien	19
III. 3. Phase symbiotique: colonisation des racines de l'hôte	20
IV. Impact des pratiques agricoles sur les CMA.	23
<u>IV. 1. Labours</u>	23
<u>IV. 2. Rotation des cultures</u>	23
<u>IV. 3. Fertilisation</u>	23
<u>IV. 4. Génétique et génotype</u>	24
<u>IV. 5. Pesticides</u>	24
V. Les mécanismes de défense induits par le champignon mycorhizien arbusculaire	25
<u>V. 1. Inductions des réactions de défense des plantes pendant les premiers stades de la</u>	25

<u>mycorhization</u>	
<u>V. 2. Réactions de défense dans les cellules végétales contenant des arbuscules</u>	26
<u>V. 3. Régulation des réactions de défense chez les plantes au cours de la symbiose mycorhizienne arbusculaire par des altérations de la voie de transduction du signal</u>	27
<u>V. 4. Régulation des réactions de défense des plantes par des hormones et des nutriments pendant la mycorhization</u>	27
VI. Bénéfices de la symbiose mycorhizienne à arbuscules	29
<u>VI. 1. Bénéfices pour le CMA</u>	29
<u>VI. 2. Bénéfices pour la plante</u>	30
VI. 2. 1. Bénéfices trophiques	30
VI. 2. 1. 1. La nutrition hydrique	30
VI. 2. 1. 2. Le Phosphore (P)	31
VI. 2. 1. 3. L'azote (N)	32
VI. 2. 1. 4. Les oligo-éléments	33
VI. 2. 2. Autres bénéfices	34
<u>III. Les stratégies de défense des plantes</u>	
I. Résistance des plantes	42
<u>I. 1. Résistance locale</u>	42
I. 1. 1. Déterminisme d'une relation hôte compatible	42
I. 1. 2. La résistance locale acquise ou Localized Acquired Resistance (LAR)	43
<u>I. 2. Résistances systémiques</u>	44
I. 2. 1. La résistance systémique acquise (SAR)	44
I. 2. 2. La résistance systémique induite (ISR)	45
I. 2. 3. La résistance induite par les champignons mycorhiziens arbusculaires CMA: la MIR pour Mycorrhizal Induced Resistance	46
II. Les mécanismes de défense des plantes	49
<u>II. 1. Les mécanismes de défenses constitutives</u>	49
<u>II. 2 Mécanismes de défense induits</u>	49
II. 2. 1. La reconnaissance des agents pathogènes par les plantes	50
II. 2. 2. Transduction du signal intracellulaire	50
II. 2. 2. 1. Par des flux ioniques	51
II. 2. 2. 2. Production de Formes Actives de l'Oxygène (FAO)	51
II. 2. 2. 3. Modifications de la phosphorylation des protéines	52
II. 2. 2. 4. Phospholipases	53
II. 2. 3. Signalisation intercellulaire	54
II. 2. 3. 1. L'acide salicylique	54
II. 2. 3. 2. L'acide jasmonique	55
II. 2. 3. 3. L'éthylène (ET)	58
II. 2. 3. 4. Autres phytohormones	59
III. Les réponses de défense tardives	59
<u>III. 1. Renforcement des parois</u>	59
III. 1. 1. La lignification	60
III. 1. 2. La callose	61
III. 1. 3. Les papilles	62
<u>III. 2. Systèmes antioxydants</u>	63
III. 2. 1. Glutathion-S-Transferase (GST)	63
III. 2. 2 L'activité catalase (CAT)	64
<u>III. 3. Les protéines de défense</u>	65
III. 3. 1. Les chitinases	66
III. 3. 2. Les glucanases	67
III. 3. 3. Les peroxydases(POX)	67

III. 3. 4. L'oxalate oxydase (OXO)	68
Partie 2: Matériels et Méthodes	
I. Matériels	70
<u>Matériels végétal et fongique</u>	70
II. Méthodes	71
<u>II. 1. Préparation du substrat et des cultures</u>	71
<u>II. 2. Infection des plants de blé par l'oidium (<i>B. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>)</u>	72
<u>II. 3. Mesure des paramètres de croissance des plants de blé</u>	72
<u>II. 4. Détermination des taux de mycorhization</u>	72
<u>II. 5. Observation cytologique</u>	73
<u>II. 6. Détection de l'accumulation de H₂O₂</u>	74
<u>II. 7. Estimation des activités enzymatiques</u>	74
II. 7. 1. L'activité POX	74
II. 7. 2. L'activité LOX	75
II. 7. 3. Dosage des protéines	75
<u>II. 8. Analyses statistiques</u>	76
Partie 3: Résultats & Discussions	
Article 1: Arbuscular mycorrhizal inoculation induced wheat to powdery mildew (<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>)	
Présentation de l'article	77
Article	79
Article 2: Impact of different factors and cultivar on the protective efficacy of arbuscular mycorrhizal fungi against wheat powdery mildew	
Présentation de l'article	106
Article	108
Conclusion générale et Perspectives	135
Références bibliographiques	139
Annexes	

Liste des abréviations

ABA:	Acide abscissique
AGT:	Appressorial germ tube (Tube germinatif appressorial)
AIA:	Acide indole-3-acétique
AJ:	Acide jasmonique
AOS:	Allène oxyde synthase
ARN:	Acide ribonucléique
AS:	Acide salicylique
<i>Bgt:</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>
<i>Bgh:</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
BTH:	Acibenzolar-S-methyl-benzothiadiazole
CAT:	Catalase
CHI:	Chitinase
CHS:	Chalcone synthase
CMA:	Champignon Mycorhizien Arbusculaire
DAB:	3-3'Diaminobenzidine
DAG:	Diacylglycérol
DAMP:	Damage-Associated Molecular Patterns
DGK:	Diacylglycérol kinase
ET:	Ethylène
ETI:	Effector-Trigered Immunity
ETS:	Effector-Trigered Susceptibility.
FAO:	Forme Activées de l'Oxygène
GST:	Glutathion S-Transférase
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
hai:	Heures après infection/hours after infection
HR:	Hypersensitive Response (Réaction d'hypersensibilité)
HSA:	Heptanoyl d'acide salicylique
ISR:	Induced Systemic Resistance (Résistance systémique induite)
LAR:	Local Acquired Resistance
LOX:	Lipoxygénase
LTP:	Lipid Transfer Protein (Protéines de transfert des lipides).

- MAMP: Microbe-Associated Molecular Patterns (Motifs moléculaires associés aux microbes)
- MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
- MeJA: Methyl Jasmonate (Jasmonate de méthyle)
- MIR: Mycorrhizal Induced Resistance
- NPR1: Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes1
- OXO: Oxalate oxydase
- PA: Phosphatidic acid (Acide phosphatidique)
- PAL: Phénylalanine ammonia-lyase
- PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns (Motifs moléculaires associés aux pathogènes)
- PC: Phosphatidylcholine
- p-CHA: P-coumaroyl-hydroxyagmatine
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PE: Phosphatidyléthanolamine
- PGPF: Plant Growth Promoting Fungi
- PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
- PGT: Primary Germ Tube (Tube germinatif primaire)
- POX: Péroxydase
- PR: Pathogenesis-Related Protein
- PRR: Pattern recognition receptors
- PTI: PAMP-Triggered Immunity
- RT-qPCR: Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction
- SAR: Systemic Acquired Resistance (Résistance systémique acquise)
- SOD: Superoxyde dismutase

Liste des figures

Figure 1: La fleur de l'épillet de blé; <i>Source:</i> "Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC)", "Home-grown Cereals Authority (HGCA)".	6
Figure 2: Les différents stades de développement du blé; <i>Source:</i> blé hybride HYN0 (onglet "le blé en général")	8
Figure 3: Cycle biologique du champignon <i>Blumeria graminis</i> responsable de l'oïdium des céréales; <i>Source:</i> http://ephytia.inra.fr/	10
Figure 4: Symptômes et structures infectieuses de <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> ; <i>Source:</i> http://www.plantwise.org/ ; http://scarab.msu.montana.edu	12
Figure 5: Évolution dans le temps de la morphogénèse structurelle de <i>Blumeria graminis</i> lors de l'infection; <i>Source:</i> Both <i>et al.</i> (2005)	13
Figure 6: Classification des champignons mycorrhiziens à arbuscules; <i>Source:</i> Redecker <i>et al.</i> (2013)	18
Figure 7: Structures intra et extraracinaires du champignon mycorrhizien arbusculaire; <i>Source:</i> www.heartspring.net	21
Figure 8: Schéma d'une cellule corticale contenant une arbuscule; <i>Source:</i> Parniske, (2008)	22
Figure 9: Les différentes phases d'établissement de la symbiose mycorrhizienne arbusculaire; <i>Source:</i> Bonfante et Genre, (2010)	22
Figure 10: Modèle hypothétique représentant les mécanismes de régulation impliqués dans les réactions de défense de la plante lors de l'établissement de la symbiose mycorrhizienne arbusculaire; <i>Source:</i> Garcia-Garrido et Ocampo, (2002)	28
Figure 11: Processus d'échanges de nutriments [phosphore (P), azote (N) et carbone (C)] dans l'ensemble des symbioses mycorrhiziennes; <i>Source:</i> Bonfante et Genre, (2010)	29
Figure 12: Principales structures cellulaires dans lesquelles le phosphore est incorporé chez les plantes; <i>Source:</i> Maathuis, (2009)	32
Figure 13: Modèle en Zig-Zag illustrant les mécanismes de défense mis en place contre les agents pathogènes; <i>Source:</i> Jones et Dangl, (2006)	43
Figure 14: Schéma des mécanismes impliqués dans la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR); <i>Source:</i> Chan, (2013)	46
Figure 15: Schéma représentant les flux ioniques dans la cellule végétale en réponse à l'infection; <i>Source:</i> Thorsten Jabs <i>et al.</i> (1997)	51
Figure 16: Biosynthèse de l'acide salicylique; <i>Source:</i> Chen <i>et al.</i> (2009)	55
Figure 17: Voie de la lipoxygénase; <i>Source:</i> Feussner <i>et al.</i> (2002)	56
Figure 18: Voie de biosynthèse de l'AJ; <i>Source:</i> Hause <i>et al.</i> (2002)	57
Figure 19: Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes; <i>Source:</i> Sriprasertsak <i>et al.</i> (2002)	62

Liste des tableaux

Tableau 1: Tableau récapitulatif de l'effet de la colonisation mycorhizienne à arbuscules sur (a) les agents phytopathogènes racinaires et (b) aériens.	38
Tableau 2: Les familles de protéines PR; <i>Source: Van Loon et al. (2006)</i>	68
Tableau 3: Composition de la solution de Hoagland; <i>Source: Hoagland et al. (1950)</i>	71

Introduction générale

-

Objectifs

Introduction générale-objectifs

Selon les dernières estimations de l'USDA (United States Department of Agriculture), environ 719 millions de tonnes de blé seront produits en 2016 dans le monde (www.igc.int), ce qui représente près d'un tiers de l'ensemble des céréales produites. Le blé est la production agricole qui subit les spéculations les plus importantes; c'est la céréale la plus consommée après le maïs et le riz et la plus échangée dans le monde. La France est le premier producteur et exportateur européen et cinquième producteur mondial. Les principales zones de production du blé tendre sont les régions Nord/Pas-de-Calais, Centre, Poitou-Charentes, Bourgogne et du Bassin parisien (<http://publications.passioncereales.fr>). Malheureusement, le blé est soumis aux attaques de nombreux bioagresseurs et ceci à différents stades de son développement. Ces attaques peuvent provoquer des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles aux maladies. Ainsi, parmi ces maladies, le blé est fréquemment soumis aux attaques d'oïdium causées par le champignon *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) dans le Nord de la France en raison de conditions climatiques favorables (Delos *et al.*, 1998). La lutte génétique contre ce parasite n'est pas efficace contre toutes les populations de *Bgt*, d'où la nécessité de l'utilisation intensive et systématique de fongicides, avec pour conséquences des problèmes environnementaux et de santé publique. En effet, les fongicides peuvent être à l'origine d'une pollution atmosphérique (Bidleman *et al.*, 1993), d'une pollution des sols via la présence de résidus qu'on retrouve également dans les productions végétales et dans les nappes phréatiques (Caylak et Tokar, 2012). Ces produits chimiques de synthèse provoquent aussi des problèmes de santé pour l'utilisateur (agriculteurs) et pour le consommateur des plantes traitées (reprotoxicité, génotoxicité, cancérogénicité) (Ritter *et al.*, 2006; Oruc, 2010; Mostafalou et Abdollahi, 2012).

De par sa vaste surface agricole et l'épandage massif et répété des pesticides chimiques, la France est le premier utilisateur européen de produits phytosanitaires (75000 tonnes de pesticides utilisées en 2014) devant l'Allemagne, et quatrième au plan mondial derrière les États-Unis, le Brésil et le Japon (<http://www.consoglobe.com/> et UIPP, 2013: union des industries de la protection des plants). Les fongicides représentent près de la moitié des tonnages de pesticides utilisés. 80% d'entre eux sont utilisés pour le traitement des céréales à paille, de la vigne, du maïs et du colza (www.notre-planete.info).

A l'échelle européenne, le règlement REACH (pour Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals), adopté le 18 décembre 2006, exige l'évaluation de toutes les substances chimiques présentes sur le marché, dont les produits phytosanitaires, en donnant

aux industriels la charge de prouver l'innocuité des substances. A l'échelle nationale, le plan d'action Ecophyto 2018, issu du Grenelle de l'environnement en 2007, visait à réduire de 50% l'usage des pesticides d'ici 2018, si possible. Néanmoins, à mi-parcours, les efforts ne semblent pas avoir été suffisants. Afin de donner un second souffle à cet effort de réduction du recours aux pesticides, le Ministre de l'Agriculture a présenté le plan Ecophyto 2. Ce second plan reporte l'objectif de baisse d'utilisation des pesticides à moins 50% d'ici 2025, avec un palier à moins 25% d'ici 2020. Les alternatives à la protection chimique sont un véritable impératif pour le développement d'une agriculture durable et plus respectueuse de l'Homme et de son environnement. Une des priorités est donc de développer des méthodes alternatives, comme celles du biocontrôle, consistant en l'utilisation d'organismes vivants ou de produits issus de ces organismes pour limiter ou réduire les pertes et les dommages causés par les organismes nuisibles. Parmi les agents de biocontrôle, les champignons mycorrhiziens ont été décrits comme de potentiels agents de lutte pour contrôler les maladies des plantes (revue de Pozo *et al.*, 2013).

En effet la symbiose mycorrhizienne, et en particulier la symbiose mycorrhizienne à arbuscules, qui concerne plus de 80% des plantes terrestres et la quasi totalité des plantes cultivées, permet à la fois une meilleure croissance et une meilleure résistance des plantes à de nombreux stress biotiques (Dalpé, 2005; Gianinazzi *et al.*, 2010; Pozo *et al.*, 2013) et abiotiques (Smith et Read, 2008 ; Debiante *et al.*, 2008; 2009; Campagnac *et al.*, 2010; Miransari *et al.*, 2010). Le potentiel des champignons mycorrhiziens à arbuscules (CMA) comme agents de biocontrôle a été décrit dans le cas de diverses infections racinaires (Khaosaad *et al.*, 2007; Fiorilli *et al.*, 2011; Castellanos-Morales *et al.*, 2012...) mais très peu dans la protection contre les maladies foliaires (Gallou *et al.*, 2011; Campos-Soriano *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Maffei *et al.*, 2014) et pas du tout dans le cas des pathogènes fongiques biotrophes. C'est pourquoi le travail réalisé lors de la présente thèse vise à :

1. Evaluer, en conditions contrôlées et en pots, l'éventuel effet protecteur de la mycorhization arbusculaire chez le blé (*Triticum aestivum* L.) contre *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, un champignon biotrophe, agent responsable d'une maladie affectant toutes les parties aériennes de la plante, l'oïdium.
2. Etudier les réactions de défense induites chez le blé mycorhizé par (i) des observations cytologiques (apposition de papilles fluorescentes, détection de

peroxyde d'hydrogène, (H₂O₂)), (ii) des mesures d'activités enzymatiques (péroxydase (POX), lipoxygénase (LOX)) et (iii) l'analyse de transcrits (expression des gènes codant pour certains marqueurs de défense tels que la (LOX), la (POX), la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), le Non-expressor Pathogenesis-Related Proteins1 (NPR1) et une protéine à activité chitinase (CH11) « Pathogenesis-Related » (PR).

3. Déterminer l'influence de quelques facteurs (concentration en phosphore, type d'inoculum mycorhizien, niveau de résistance du cultivar de blé) sur l'efficacité de la protection du blé contre *Bgt* en réponse à l'inoculation par les CMA.

L'organisation de la présente thèse et l'articulation des différentes parties qui la composent se feront comme suit:

- **La partie 1** de ce manuscrit consiste en une analyse bibliographique présentant:
 - I. Le pathosystème étudié: blé/oïdium
 - II. L'agent de biocontrôle: les champignons mycorhiziens à arbuscules.
 - III. Les stratégies de défense des plantes
- **La partie 2** décrit les méthodologies expérimentales utilisées lors de ce travail pour répondre aux questions posées.
- **La partie 3** présente les résultats obtenus et leurs discussions sous forme de deux publications soumises:
 - **La Publication 1** traite de la protection contre l'oïdium du blé grâce à l'inoculation par les CMA puis, des éventuels mécanismes de défense impliqués dans cette protection. Le titre de cet article est: « **Arbuscular mycorrhizal inoculation induced resistance in wheat to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)** » par G. Mustafa, N.G. Khong, B. Tisserant, B. Randoux, J. Fontaine, M. Magnin-Robert, Ph. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui, soumis dans *New Phytologist*.
 - **La Publication 2** concerne l'étude de quelques facteurs influençant la protection du blé contre l'oïdium suite à la mycorhization arbusculaire. Cet article s'intitule: « **Impact of different factors on the protective efficacy of arbuscular mycorrhizal fungi against wheat powdery mildew** » par G. Mustafa, B.

Randoux, B. Tisserant, J. Fontaine, M. Magnin-Robert, A. Lounès-Hadj Saharaoui,
Ph. Reignault soumis dans *Mycorrhiza*.

Enfin cette thèse se termine par une conclusion générale qui débouche sur les perspectives envisagées pour la poursuite de ce travail

Partie 1:

Synthèse bibliographique

I. Le pathosystème étudié:

blé/oïdium

1. La plante: Le blé

I. Généralités

L'ensemble des espèces de blé appartiennent au genre *Triticum*, les deux espèces les plus cultivées et présentant un important intérêt économique sont:

- le blé dur (*Triticum turgidum* ssp. *durum*), riche en gluten mais dépourvu de gluténines de grande taille, et dont les grains servent principalement à la fabrication de semoule utilisée notamment dans les pâtes alimentaires (Clarke *et al.*, 2005);

- le blé tendre (*Triticum aestivum*), le plus cultivé et utilisé dans la production de farine panifiable.

Triticum aestivum est issu de deux hybridations naturelles successives:

(i) *Triticum monococcum* (A/A) et *Aegilops speltoides* (B/B) a donné un hybride, l'espèce cultivée *Triticum turgidum* ssp. *durum* ($2n = 28$) correspondant à une forme évoluée de *Triticum turgidum* ssp. *diccoides*. Les deux génomes des céréales se sont révélés fonctionnels chez cet hybride, plante qui s'est révélée fertile, soit un génome de type AABB.

(ii) Cet hybride se serait ensuite croisé avec *Triticum tauschii* ssp. *strangulata* (synonyme *Aegilops squarrosa*) ajoutant le génome de type DD.

L'hexaploïdie de *Triticum aestivum* est le résultat d'une duplication du nombre de chromosomes obtenus après le croisement. Le génome de *Triticum aestivum* est alors identifié comme étant de type AABBDD (Chantret *et al.*, 2005).

Les périodes de semis sont variables suivant qu'il s'agisse de blé d'hiver ou de printemps. Le blé d'hiver est semé de septembre à novembre, voire décembre dans l'hémisphère Nord, et les grains sont récoltés à compter du mois de juin. Pour le blé de printemps, les semis se font au cours du printemps et la récolte s'effectue vers la fin de l'été ou le début de l'automne (août, septembre et octobre). Il existe plus de 20 000 cultivars de blé et chaque année des centaines de nouveaux cultivars sont créés.

II. Caractéristiques biologiques

II. 1. Morphologie de la plante

Le blé est une plante herbacée annuelle appartenant à la classe des Monocotylédones, à l'ordre des Cypéales et à la famille des Poacées (Graminées). Une des principales caractéristiques morphologiques de l'appareil végétatif du blé est la présence de feuilles alternes. Les tiges appelées « chaumes » sont des tubes cannelés regroupant un ensemble de faisceaux conducteurs. Les feuilles émergent des tiges aux niveaux des nœuds et s'allongent en un limbe constitué de nervures parallèles. A l'extrémité des chaumes se distingue un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis situés de part et d'autre de l'axe.

Chaque épillet regroupe trois fleurs situées à l'intérieur de deux bractées appelées glumes, et chaque fleur est entourée de deux glumelles. La fleur (Figure 1) ayant pour particularité d'être cléistogame (le pollen est relâché avant que les étamines ne sortent de la fleur), et la plante étant hermaphrodite, la fécondation s'effectue majoritairement sous forme d'autofécondation. Ce caractère a été conservé au cours des améliorations variétales. Le fruit est un caryopse, fruit qui correspond à la fusion du tégument séminal et de la paroi du fruit. Le caryopse est alors dénommé le grain.

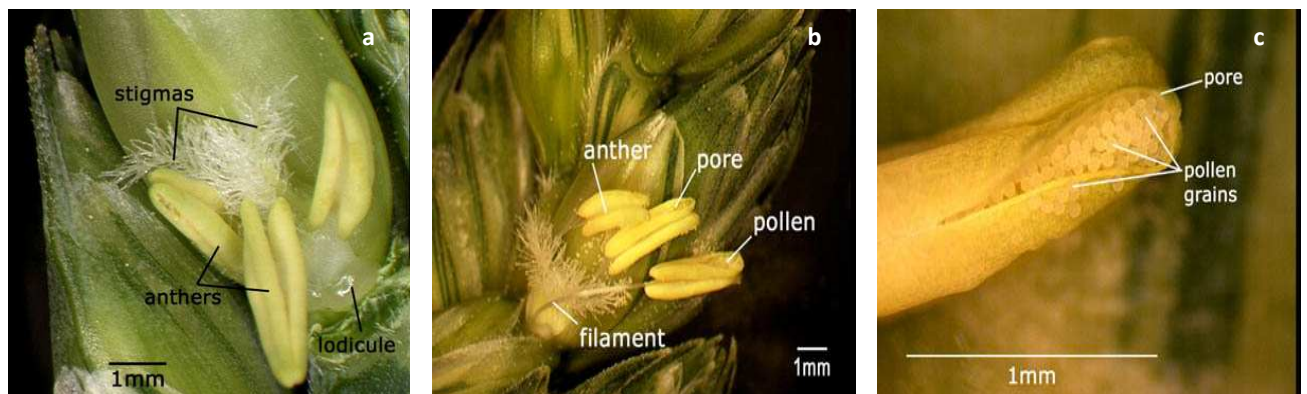


Figure 1: La fleur de l'épillet de blé

a: Vue d'ensemble de l'appareil reproducteur hermaphrodite

b: Localisation des sacs polliniques - c: Ouverture d'un sac et libération des grains de pollen

Source: "Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC)"
"Home-grown Cereals Authority (HGCA)"

II. 2. Evolution du grain: germination et développement d'une plante

Le grain, pour débuter un processus de germination, nécessite une hydratation prégerminative. La germination débouche tout d'abord sur la formation d'une radicule correspondant à une première petite racine, puis à l'émergence d'un coléoptile correspondant à l'ébauche de l'organe aérien. Une première feuille apparaît alors à l'extrémité du coléoptile. L'axe portant le bourgeon terminal se différencie en une tige souterraine, le rhizome, dont la partie supérieure est à l'origine du plateau de tallage. La levée est l'un des stades essentiels de la culture du blé. Elle débute lorsque le limbe des premières feuilles émerge de la partie souterraine. Le stade « 3 feuilles » (Figure 2c) correspond également à une étape importante dans le développement de la plante. Les trois feuilles indiquent la formation des bourgeons à l'aisselle des feuilles, qui donneront naissance à de nouvelles pousses. Le stade « 3 feuilles »

est un stade clé qui va décider de la continuité de la croissance. En effet, d'autres étapes (Figure 2) seront induites suite à la formation des bourgeons telles que:

- le tallage (Figure 2d) caractérisé par l'apparition de tiges secondaires donnant à la plante un port retombant;

- la montaison, caractérisée d'une part par le développement de l'épi et, d'autre part par l'apparition des dernières feuilles dont le rôle est primordial dans le remplissage des grains;

- l'épiaison, correspondant à la sortie de l'épi proprement dite. A ce stade, chaque fleur peut donner un grain (Figure 2e, f, g, h);

- la floraison, terme indiquant le moment où les étamines sont visibles en dehors des glumelles (Figure 2i);

- la formation du grain qui correspond à l'étape ultime du cycle de développement. A ce niveau, les grains vont accumuler des réserves en amidon jusqu'à maturité de l'épi. L'épi mûr est doté d'une couleur jaune doré qui indique que la moisson peut avoir lieu (Figure 2j, k, l).

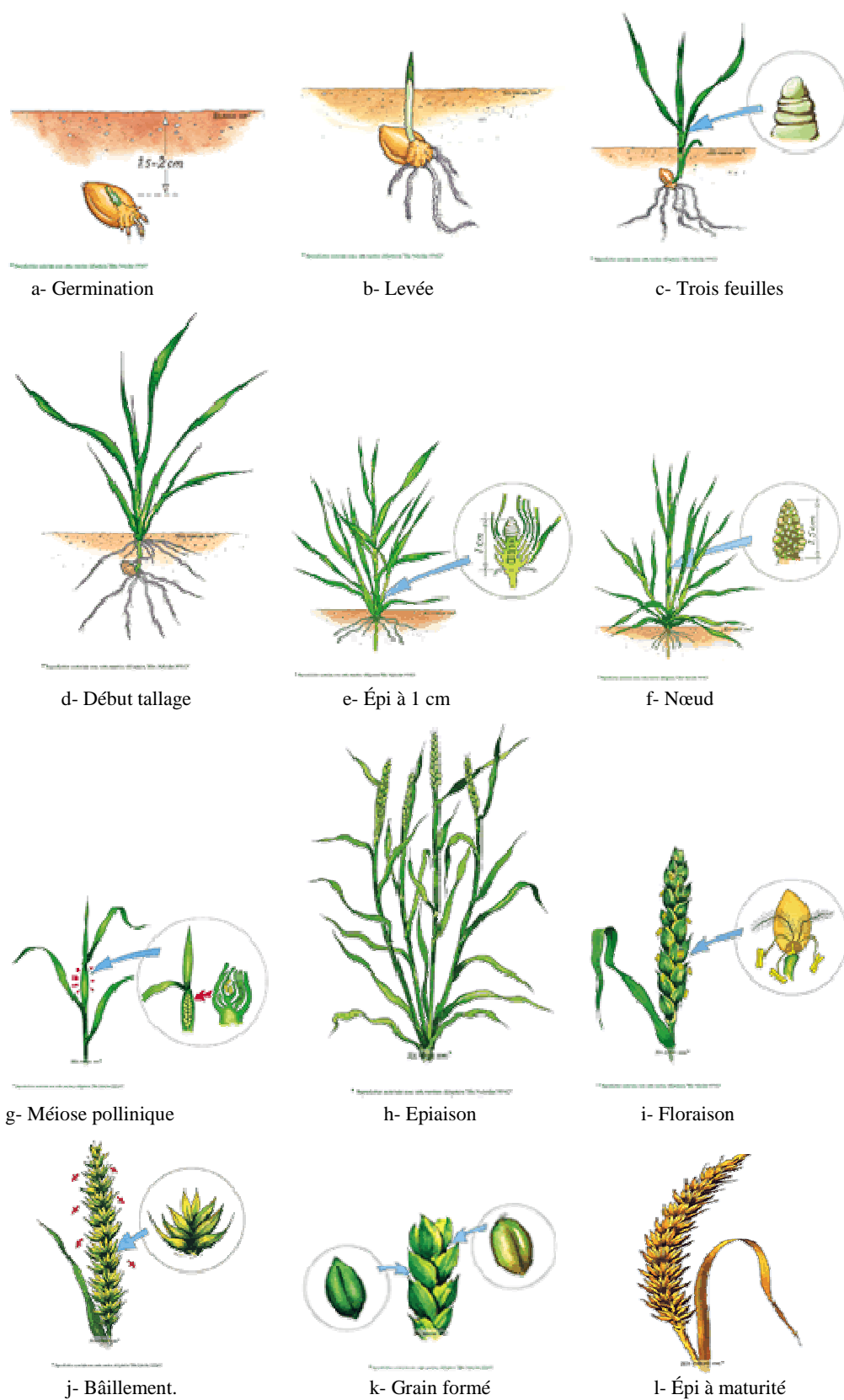


Figure 2 : Les différents stades de développement du blé
Source: blé hybride HYN0 (onglet "le blé en général")

2. L'oidium du Blé

Les champignons responsables des maladies désignées sous le nom d' « oïdiums » appartiennent à l'ordre des Erysiphales (famille des Erysiphaceae) au sein de la classe des Ascomycètes (Bolay, 2005). L'existence de formes spéciales impliquées dans la spécificité d'hôte permet de distinguer par exemple *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* chez le blé, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) chez l'orge et *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* chez l'avoine. De plus, on peut observer pour l'oïdium une spécificité de type race-cultivar de plante, c'est à dire qu'un champignon ne se développe que sur une plante de génotype bien précis. Outre ce double niveau de spécificité, l'oïdium des céréales se caractérise par son parasitisme obligatoire: le développement du champignon ne s'effectue que sur une plante hôte vivante sans laquelle la germination avancée des spores infectieuses ne peut être réalisée. L'oïdium est aussi un ectoparasite: lorsque le stimulus de contact entre la plante et le champignon a eu lieu, le champignon émet des structures qui ne se développent qu'à la surface des cellules épidermiques de la plante.

I. Symptômes et cycle de développement du pathogène

L'oïdium, est une maladie qui peut causer des dommages considérables. Les cultivars de blé n'ont pas tous la même sensibilité vis-à-vis de cette maladie. Avec les variétés sensibles, les pertes de rendement peuvent être élevées et atteignent jusqu'à 30 % (Briceño-Felix *et al.*, 2008). L'oïdium est une maladie facile à diagnostiquer chez les céréales. Les symptômes de cette maladie peuvent être observés sur les feuilles, les tiges et les épis, mais ce sont les feuilles qui sont le plus souvent attaquées. L'oïdium est caractérisé par un cycle de développement avec une phase sexuée et une phase asexuée (Figure 3). Généralement, des pustules blanches se développent, et produisent une masse de spores (conidies) donnant une apparence poudreuse aux symptômes (Figure 4a). Au fur et à mesure de leur croissance, les pustules d'oïdium foncent et prennent une couleur grise ou brune. La dissémination est due aux conidies qui sont dispersées par un mode anémophile. À terme, des structures de reproduction sexuée contenant des ascospores noires, les cléistothèces (Figure 4b), sont incorporées dans les pustules de l'oïdium, généralement vers la fin de la saison. Les ascospores produites servent à la contamination l'année suivante, ces spores sont capables de se conserver durant l'hiver. Le blé d'hiver à semis tardif est particulièrement sensible aux attaques de l'oïdium, notamment lorsque les cultures se développent rapidement au printemps. L'utilisation de quantités importantes d'engrais azoté favorise la maladie, et l'oïdium peut être particulièrement sévère dans les parcelles de semis trop denses (Edmunds et Pottorff, 2012). Il prive la plante d'une partie des éléments nutritifs, dégrade la cuticule de la feuille, diminue la

photosynthèse et entraîne une augmentation de la respiration et des pertes en eau (<http://www.dowagro.com/>).

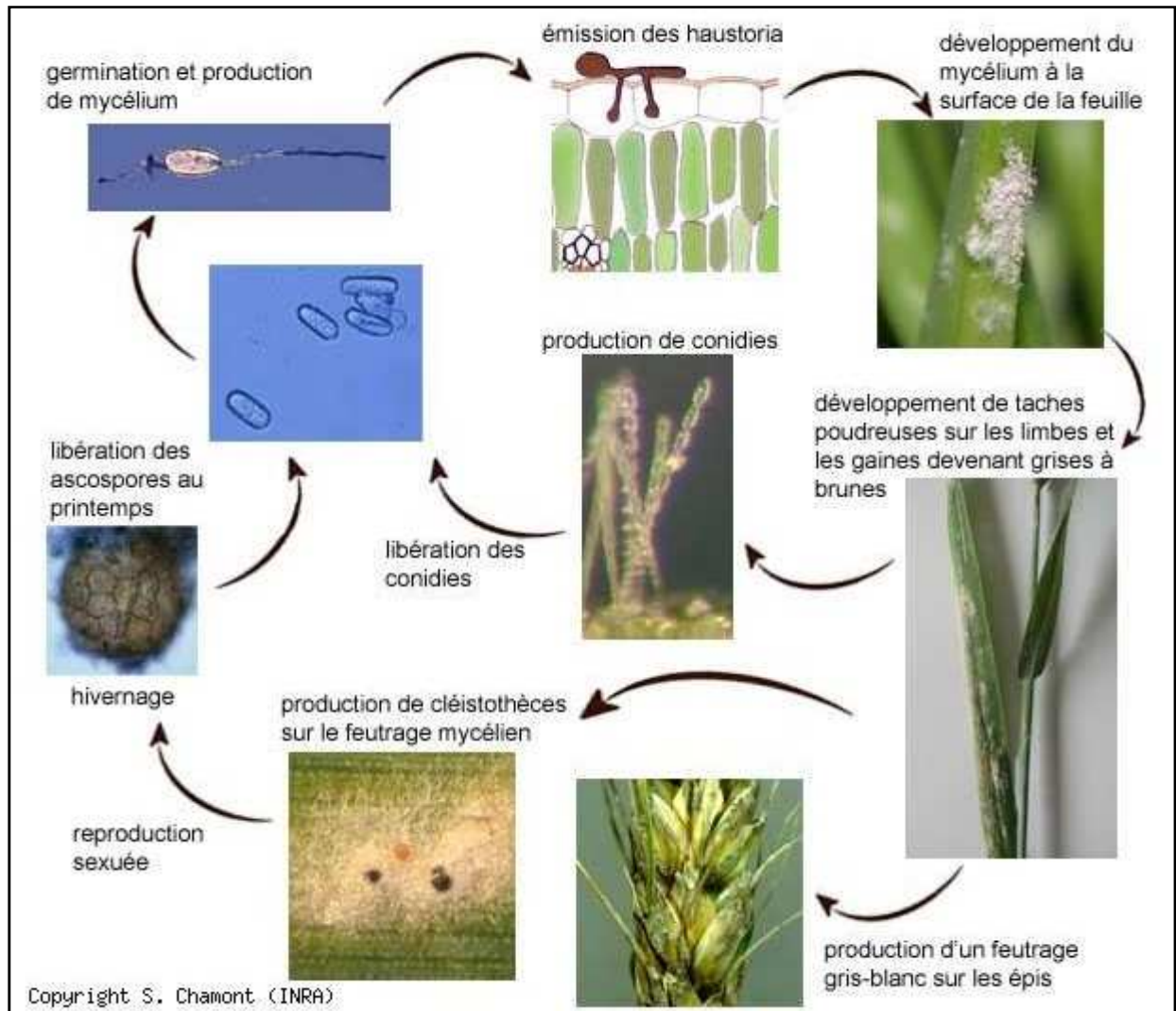


Figure 3: Cycle biologique du champignon *Blumeria graminis* responsable de l'oïdium des céréales.

Source: (<http://ephytia.inra.fr/>)

II. Mécanisme d'infection par *Bgt*

II. 1. La germination des conidies

Les conidies infectieuses (Figure 5) caractéristiques de l'oïdium ne germent pas en général si elles sont encore attachées au conidiophore de la colonie mère. Cependant, dès que les conidies adhèrent à la plante, un stimulus de contact est émis par chacun des deux partenaires (Carver *et al.*, 1996), et les conidies entrent ainsi rapidement dans le processus de germination. Celle-ci débute par l'émergence d'un tube visible issu de la conidie (Green *et al.*, 2002). Nicholson *et al.*, (1995) ont montré que les conidies non-germées produisaient un

exsudat suite au contact avec la cuticule qui induit alors la formation du tube germinatif. Ce matériel extracellulaire fongique est impliqué dans l'adhésion des conidies sur la surface foliaire (Epstein et Nicholson, 1997). Pascholati *et al.* (1992) ont analysé l'exsudat et ont montré qu'il contenait une activité cutinase. De plus, Kunoh *et al.* (1990) ont montré que la dégradation de la cutine et la cuticule par cet exsudat conidial rendait les feuilles des plantes moins hydrophobes et donc plus sensibles à l'infection.

II. 2. La formation du tube germinatif primaire (TGP)

Green *et al.* (2002) ont étudié la formation du tube germinatif primaire (TGP), et ont montré qu'il ne pouvait être fonctionnel qu'au contact de la plante hôte (Figure 5). C'est ce stimulus de contact qui va permettre l'émergence d'un second tube qui s'allongera et différenciera à son extrémité l'appressorium. La fonctionnalité du TGP a été étudiée par Nielsen *et al.* (2000) qui considèrent que la conidie est capable de percevoir des signaux chimiques externes (monomères de cutine) de la plante hôte. Ces molécules seront dégradées par des cutinases de l'exsudat conidial, ce qui participe à la formation d'un TGP fonctionnel.

Trois rôles majeurs du TGP ont été démontrés:

- Le TGP participe activement à l'adhésion de la structure fongique sur la surface hôte foliaire. L'adhésion s'effectue rapidement, c'est-à-dire dans les deux heures qui suivent l'infection (Yamaoka et Takeuchi, 1999);

- Le TGP permet l'accès aux réserves de la plante, et particulièrement les réserves hydriques (Carver et Bushnell, 1983);

- Le TGP est capable de reconnaître les caractéristiques hydrophobes de la surface de contact. La conséquence principale et immédiate de cette reconnaissance est la mise en place d'un signal intracellulaire via une protéine kinase va conduire à la différenciation d'un second tube, le tube germinatif appressorial (TGA) (Carver *et al.*, 1996). Le signal intracellulaire provient de l'absorption par le TGP des produits de dégradation de la cuticule de la plante via des cutinases fongiques. L'initiation du TGA est donc issue de la dégradation à l'extrémité du TGP de la cuticule de la paroi végétale (Pryce-Jones *et al.*, 1999).

II. 3. Le tube germinatif appressorial (TGA)

L'hydrophobicité du substrat, la présence de cellulose et de monomères de cutine augmentent la proportion de conidies de *Blumeria graminis* développant un TGA (Figure 5). Celui-ci développera par la suite un haustorium fonctionnel (Carver *et al.*, 1996 ; Francis *et al.*, 1996). Afin d'établir l'infection, *Blumeria graminis* dégrade la cuticule et la paroi de la

plante hôte et pénètre alors la papille, connue comme une réponse de la plante à la pénétration du champignon (Zeyen *et al.*, 2002). Ainsi, la pénétration du TGA est un processus qui se fait en deux temps (Belanger *et al.*, 2002):

- L'hydrolyse enzymatique permet au TGA de traverser la paroi végétale;
- La pression effectuée par le TGA contre la papille permet l'accès aux réserves de la cellule épidermique de la plante.

II. 4. L'haustorium

Après la pénétration de la paroi et de la papille végétale, le TGA repousse la membrane plasmique de la cellule végétale et croît jusqu'à former une structure d'absorption spécialisée définie sous le terme d'haustorium ou suçoir (Figure 5). L'haustorium est constitué d'un corps qui émet des digitations latérales servant à augmenter la surface de contact avec l'intérieur de l'hôte (Manners et Gay, 1983). Il est constitué d'une membrane plasmique, de cytoplasme et d'une paroi. Il est uni-nucléé et est impliqué dans des fonctions bien précises comme:

- le transfert de nutriments au cours de l'interaction blé-oïdium, comme celui du glucose du blé vers *Bgt* (Sutton *et al.*, 1999; Manners et Gay, 1982).
- la reconnaissance de molécules « signal » potentielles, dont la nature reste encore à déterminer (Heath et Skalamera, 1997).

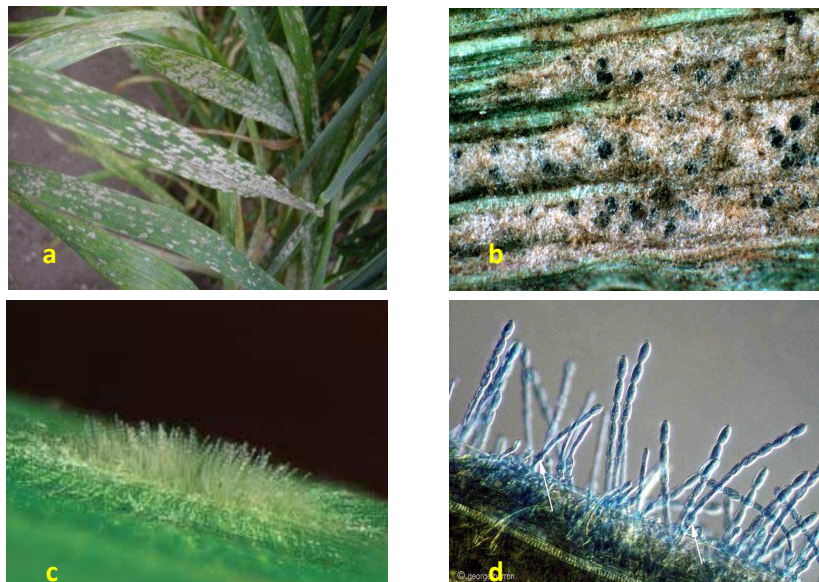


Figure 4: Symptômes et structures infectieuses de *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*
a: Symptômes foliaires; b: cleistothèces; c: pustule infectieuse vue de côté; d: chaînes de conidies
Source : (<http://www.plantwise.org> ; <http://scarab.msu.montana.edu>)

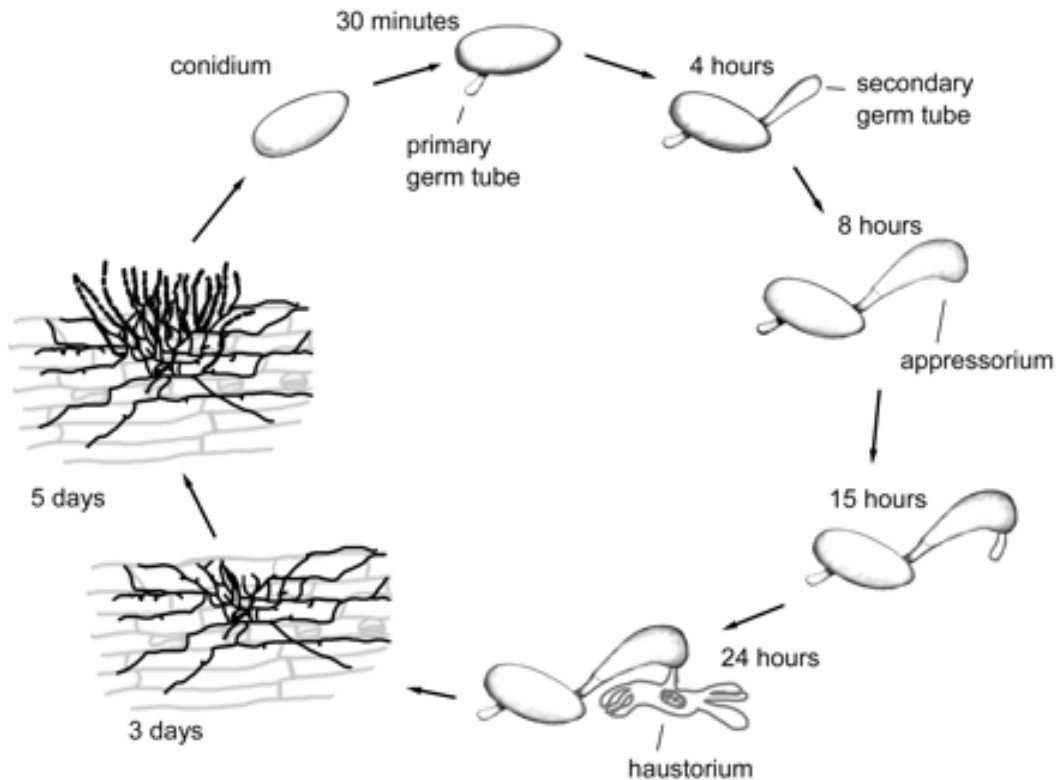


Figure 5: Évolution dans le temps de la morphogénèse structurelle de *Blumeria graminis* lors de l'infection

Source: Both et al. (2005)

III. Conditions favorables au développement de la maladie

Le développement de l'oïdium dépend davantage des conditions de température que de celles de l'humidité de l'air.

- **Température:** La température minimale de germination des conidies est de 5-7°C et s'accélère nettement à partir de 16-21°C (Constant, 2008). La gamme de températures optimales pour le développement du champignon est comprise entre 22 et 28°C. A 25°C, les conidies germent en 5 heures, contre 15 heures à 13°C et 20 heures à 30°C, et la durée d'incubation (temps qui sépare la germination des conidies de l'émission de nouvelles conidies) est de 5 jours. Au delà de 40°C, l'oïdium ne se développe plus et meurt au delà de 45°C.
- **Humidité:** Bien qu'elles n'aient pas besoin d'eau liquide (donc de pluie) pour germer, la germination des conidies est favorisée par de fortes hygrométries (au delà de 70% d'humidité relative): la production de conidies est doublée en 24 heures lorsque l'on passe d'une humidité relative de 30-40% à 100% (Galet, 1999). En revanche, les

fortes pluies, probablement en lessivant les conidies et le mycélium, perturbent le développement de l'oïdium. Il semblerait cependant que les pluies estivales en région méridionales favorisent le développement de la maladie. L'effet de ces pluies serait indirect. Dans ces régions, les températures maximales dépassent très souvent les températures de développement optimal de l'oïdium. Les pluies abaissent la température de l'air à un niveau plus favorable au développement du champignon (Constant, 2008).

- **Vent:** en favorisant la dissémination des conidies et en tempérant parfois les températures estivales excessives, le vent est un facteur de propagation de la maladie. Ceci est d'autant plus vrai pour les vents marins chargés d'humidité. De plus, le vent perturbe fréquemment les pulvérisations ou les poudrages de fongicides et diminue donc la qualité de la protection (Rouzet *et al.*, 2007).

IV. Moyens de lutte contre l'oïdium

IV. 1. La lutte génétique

La résistance est un caractère majeur des schémas d'amélioration variétale pour lutter contre les maladies des cultures. Chez le blé, il est établit une échelle de sensibilité-résistance à *Bgt*, qui s'échelonne entre 1 à 9 avec (1): sensible, (2-3): assez sensible, (4-5): peu sensible, (6-7): assez résistant, (8-9): résistant (Syngenta, www.ccbenoist.fr). Par exemple, Orvantis est un cultivar de blé assez sensible à l'oïdium avec une degré (5) de résistance et Lord est assez résistant (7), sur une échelle de 1 à 9. Les cultivars résistants présentent des avantages significatifs et contribuent fortement à réduire la dépendance aux fongicides. Pour une saison donnée, le nombre d'applications de fongicides peut être réduit de la moitié ou d'un tiers, et les doses utilisées peuvent être réduites de 25 à 50 %. L'utilisation de cultivars résistants permettrait de réduire les coûts en économisant jusqu'à 20€/ha par rapport aux cultivars sensibles. Cependant, l'utilisation de cultivars résistants ne résout pas tous les problèmes et ne constituent souvent qu'une solution temporaire en raison de l'adaptation génétique du champignon. La durabilité des gènes de résistance varie avec le temps (Jorgensen *et al.*, 2010). Bien que les gènes *Pm* (gène résistant à l'oïdium) identifiés dans le cadre de la relation gène-pour-gène soient disponibles pour la sélection, ils ont tendance à être non-durables, car l'agent pathogène les contourne rapidement par mutation unique du gène d'avirulence *Avr* correspondant au gène *R* (McDonald et Linde, 2002).

Dans le cas de l'orge, il a été montré par Piffanelli *et al.* (2002) que l'allèle récessif *mlo* (Mildew resistance locus-o) assure une résistance contre l'oïdium qui repose sur la perte de

fonction chez la plante d'un récepteur membranaire, liée à la mort de quelques cellules autour du site de pénétration du champignon et à la limitation de sa progression par l'apposition des parois cellulaires (papilles). Chez le blé, la réaction hypersensible (HR pour Hypersensitive Response) est le résultat de l'expression de gènes de résistance *Pm* qui permettent la mise en place d'une résistance totale contre *Bgt* (Das et Griffey, 1995). Le principe de la HR sera présenté dans le chapitre « mécanismes de défenses ».

IV. 2. Mise en œuvre des pratiques culturales

- **Eviter les semis trop tardifs** : Un semis tardif aura tendance à accentuer les conséquences de la maladie. Plus le semis est tardif, plus la floraison est décalée (fin juin). Les plantes pendant la floraison sont particulièrement favorables au développement de l'oïdium et à une attaque plus intensive (temps couvert et humide) (Seutin et Bodso, 2012).

- **Eviter les cultures très denses** : Un peuplement trop dense au printemps favorise le maintien d'une humidité importante dans le couvert végétal, ce qui est incontestablement propice au développement des champignons. Une sur fertilisation azotée, résultant en des feuilles plus vertes, plus poussantes, favorise également l'expansion de la maladie (Seutin et Bodso, 2012).

IV. 3. La lutte chimique

La dépense moyenne de fongicide sur le blé tendre s'établit en 2014 à 87€/ha par rapport à 80€/ha en 2013 (<http://www.arvalis-infosfr>). Actuellement, plusieurs familles de fongicides sont utilisées contre *B. graminis*: (i) les inhibiteurs de la synthèse des stérols (IBS) comme les triazoles; (ii) les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques spécifique comme les 2-aminopyrimidines (iii) les strobilurines ou « Quinone outside Inhibitors » (QoI) qui inhibent le site d'oxydation du coenzyme Q situé sur la face externe du cytochrome b de la mitochondrie (iv) les phénoxyquinoléines (Bernard et Rameil, 2005). L'utilisation intensive et systématique de fongicides pose des problèmes environnementaux: pollution des nappes phréatiques et pollution aérienne, présence de résidus dans les sols et les débris végétaux; elle pose également des problèmes de santé pour l'utilisateur des fongicides et pour le consommateur. Par exemple : le Mancozèbe (un fongicide systémique appartenant à la famille des carbamates) et l'éthylène thiourée sont cancérigènes (Oruc, 2010; Kumar *et al.*, 2013).

Par ailleurs, leur coût est très élevé et certains produits présentent une toxicité aiguë pour les organismes non cibles (Leroux, 2004; Le Grusse, 2012). De plus, les agents pathogènes peuvent devenir résistants à ces produits chimiques, ce qui a entraîné l'arrêt de l'utilisation de certains fongicides (Panon *et al.*, 2006).

IV. 4. Les stimulateurs de défense des plantes

L'application de stimulateurs de défense des plantes (SDP) constitue une alternative potentielle pour protéger les cultures contre les agents pathogènes (Benhamou et Picard 1999). Il s'agit de produits contenant des matières actives d'origine naturelle ou de synthèse destinés à induire les mécanismes de défense naturelles de la plante. L'emploi de certains de ces produits est autorisé en tant que « stimulateurs des défenses naturelles » et peuvent être utilisés au champ contre différentes maladies. Par exemple, Vacciplant® (Goëmar), dont la matière active est la laminarine, est autorisé contre l'oïdium du blé <http://www.vacciplant.fr/>. Les SDP appartiennent à la classe des produits de biocontrôle, qui représentent actuellement 5% du marché des produits phytosanitaires (www.lafranceagricole.fr). D'une manière générale, ce type de produits ne semble pas présenter de risque de toxicité pour l'environnement <http://www.vacciplant.fr/>. Certains d'entre eux ont montré au laboratoire une efficacité de protection dans le cadre du pathosystème blé-oïdium, notamment le Milsana® (Randoux *et al.*, 2006), le Iodus 40® (Renard-Merlier *et al.*, 2007), le trehalose (Reignault *et al.*, 2001) et l'heptanoyl d'acide salicylique (HSA), un dérivé fonctionnel de l'AS.

**II. L'agent de biocontrôle:
Les Champignons mycorhiziens à
arbuscules (CMA)**

I. Généralités

La grande majorité des végétaux terrestres vivent en étroite collaboration avec de nombreux organismes du sol parmi lesquels existent les champignons mycorhiziens jouent un rôle primordial. L'étude de fossiles du Dévonien supérieur a révélé que les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) et les plantes sont devenus étroitement liés, interdépendants, il y a de cela plus de 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000). C'est ainsi que les CMA ont directement contribué à l'évolution du monde vivant, au développement de la biodiversité, à la survie des végétaux et par conséquent à l'équilibre des écosystèmes actuels.

Ces champignons biotrophes obligatoires sont capables de coloniser près de 90% des plantes terrestres (Smith et Read, 2008) et sont présents dans différents milieux tels que les forêts boréales, tropicales et tempérées ainsi que les toundras, les prairies et de nombreuses terres cultivées (Read et Perez-Moreno, 2003). Cette symbiose mycorhizienne est observable chez de nombreuses espèces végétales, qu'il s'agisse des mousses, des fougères, des gymnospermes et des angiospermes (monocotylédone et dicotylédone) (Brundrett, 2009). Cette symbiose est d'ailleurs retrouvée chez des plantes cultivées à grande échelle, comme le blé, le maïs, le riz et le soja (Bonfante et Perotto, 1995; Smith et Read, 2008; Garcia-Garrido *et al.*, 2000). Parmi les espèces végétales formant peu ou pas ce type d'association, nous pouvons distinguer les plantes qui appartiennent aux familles des *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae* et *Urticaceae*, sans oublier le genre *Lupinus*, une exception de la famille des *Fabaceae* habituellement mycotrophe (Sumbali *et al.*, 2009).

II. Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules

Les études morphologiques et phylogénétiques ont permis de regrouper toutes les espèces mycorhiziennes à arbuscules dans le phylum des Gloméromycètes (Figure 6) (Schüßler *et al.*, 2001) et de distinguer quatre ordres: les Glomérales, les Paragloméra, les Archéosporales et les Diversispora (Oehl *et al.*, 2011; Redecker *et al.*, 2013). Parmi les Gloméromycètes, nous observons une grande diversité morphologique, notamment au niveau des spores dont la taille, la couleur et la forme sont très variables suivant les espèces étudiées. Aujourd'hui, on dénombre environ 18 genres comprenant 250 espèces. Cette estimation pourrait s'avérer largement en dessous de la réalité puisque la taxonomie actuelle repose sur des espèces isolées à partir de spores, alors que des techniques moléculaires émergentes permettent d'obtenir des séquences à partir de racines ou du sol, donnant ainsi accès à des espèces non-sporogènes ou difficilement détectables (Öpik *et al.*, 2013).

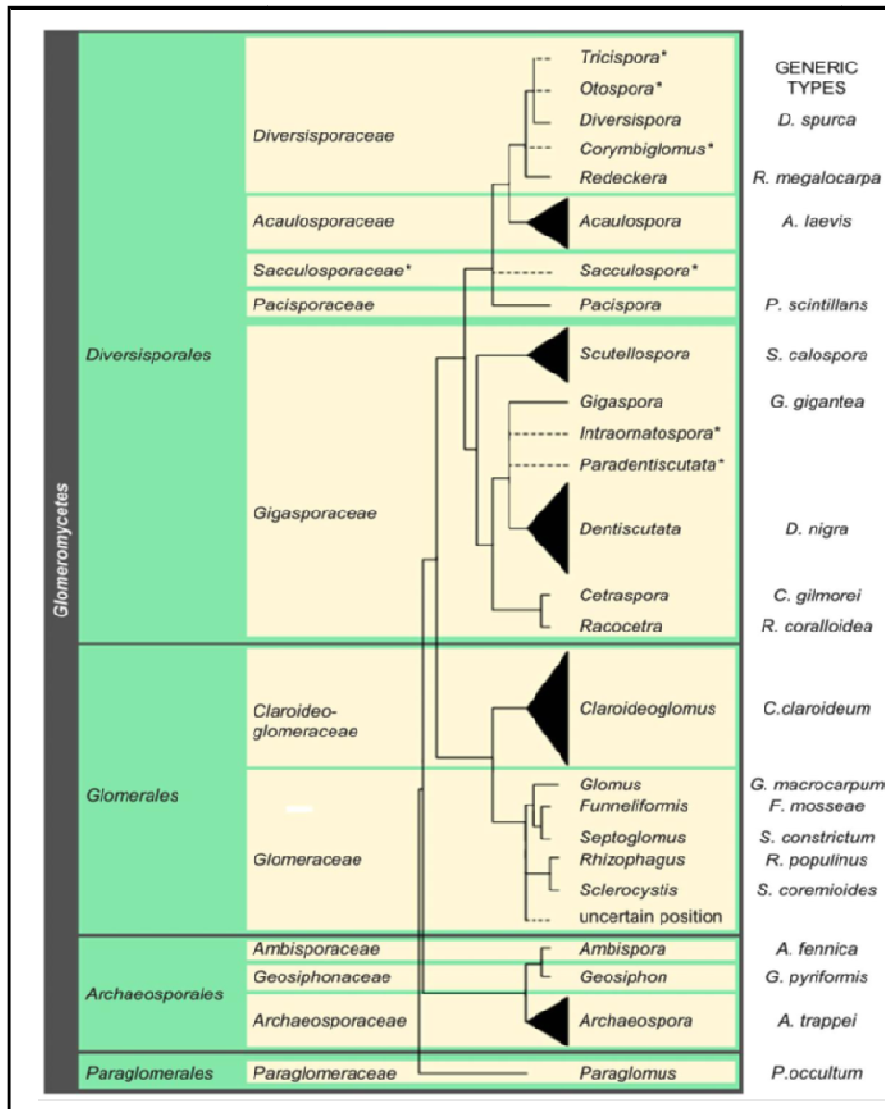


Figure 6: Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules (Redecker *et al.*, 2013)

III. Cycle de développement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire

Les CMA sont des biotrophes obligatoires incapables de compléter leur cycle de vie de manière asymbiotique (Bonfante et Bianciotto, 1995). D'après Requena *et al.* (2007), l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules débute par le contact entre une racine compatible avec les hyphes germinatives produites par les propagules du CMA (spores asexuées ou racines déjà mycorhizées). Le cycle de développement des CMA se divise en cinq stades:

Stade 1 : Germination des spores et émergence d'un mycélium primaire, ou promycélium.

Stade 2 : Contact racinaire et développement d'un hyphopode.

Stade 3 : Pénétration du CMA dans la racine et mise en place de la forme intraracinaire du champignon. Le mycélium pénètre à l'intérieur du système racinaire, se renfle en vésicules et forme des arbuscules.

Stade 4 : La mycorhize ainsi formée produit un réseau extra-racinaire à partir duquel sont différenciées de nouvelles spores.

Stade 5 : Après leur maturation, ces spores seront à l'origine du promycélium de départ (stade 1).

Les CMA produisent un grand nombre de spores rondes à paroi épaisse, d'un diamètre de 50 à 100 µm contenant environ 2000 noyaux par spore (Bécard et Pfeffer, 1993) et stockant de grandes quantités d'éléments carbonés, principalement sous forme de lipides de réserve (Sanchole *et al.*, 2001).

La colonisation des racines par ces champignons suit une série de trois phases (Figure 9):

III. 1. Phase asymbiotique: germination de la spore et ramification de l'hyphe germinative

Dans des conditions favorables, les spores peuvent germer spontanément et produire une hyphe germinative et quelques ramifications primaires sans stimulus exogène. Lorsqu'aucun partenaire végétal est à proximité, les hyphes germinatives se cloisonnent et le cytoplasme se rétracte dans la spore (Requena *et al.*, 2007). Les spores des CMA sont capables de germer et d'entrer à nouveau en dormance de nombreuses fois si des signaux racinaires ne sont pas perçus (Koske, 1981). Dans tous les cas, l'essentiel des réserves énergétiques des spores initiales est conservé.

III. 2. Phase pré-symbiotique: Le dialogue entre une plante et un champignon mycorhizien

Avant le premier contact physique, les deux partenaires de la symbiose émettent des signaux dans le sol qui leur permettent d'être informés de leur présence respective. Un certain nombre de gènes impliqués dans l'établissement de la symbiose seront alors activés (Bonfante et Genre, 2010).

1. Signaux émis par les végétaux

Les plantes produisent des exsudats racinaires capables de stimuler la germination, d'induire une ramification des hyphes et de modifier l'activité métabolique du CMA

(Giovannetti *et al.*, 1998; Buée *et al.*, 2000; Nagahashi et Douds, 2000). Dénommées «*branching factors*», ces molécules ont été identifiées comme étant des strigolactones, un dérivé des apocaroténoïdes, résultant d'un clivage oxydatif de caroténoïdes (Buée *et al.*, 2000; Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006; 2007; Besserer *et al.*, 2009). Les strigolactones provoquent chez le champignon l'oxydation des acides gras et la production d'ATP, ces réponses étant dépendantes d'une NADH déshydrogénase et d'une oxydase alternative dans la chaîne respiratoire (Besserer *et al.*, 2008, 2009).

En plus des strigolactones, d'autres molécules ont été décrites comme potentiellement perçues par les CMA, même si leur rôle reste encore à définir. Différents flavonoïdes ou polyamines ont montré un effet sur la germination des spores ou la ramification des hyphes, toutefois leurs effets sur l'établissement de la symbiose sont contrastés, montrant des effets positifs dans certains cas et des effets négatifs dans d'autres cas (Steinkellner *et al.*, 2007; Scervino *et al.*, 2007; Hassan et Mathesius, 2012; Cheng *et al.*, 2012).

2. Signaux émis par le CMA

De même que pour les signaux «Nod factors» émis par les Rhizobiums, les CMA produisent des molécules diffuses qui leur permettent d'être reconnus par les plantes. Ces molécules appelées «Myc factors» induisent l'activation de gènes chez la plante hôte relatifs à l'établissement de la symbiose (revue de Paszkowski, 2006; Bonfante et Requena, 2011). Parmi ces molécules sécrétées par le champignon, les Myc-LCO (LCO: lipochitooligosaccharides) ont été récemment décrites comme jouant un rôle dans la préparation de la plante à la colonisation mycorhizienne arbusculaire (Maillet *et al.*, 2011). Ces composés favorisent la mycorhization des plantes lorsqu'ils sont ajoutés de manière exogène, et induisent également la formation de racines latérales (Maillet *et al.*, 2011). Une fois ces premiers signaux échangés, les deux partenaires mettent en place une régulation génique propre à l'établissement de la symbiose.

III. 3. Phase symbiotique : colonisation des racines de l'hôte

Le champignon forme une structure renflée au contact de l'épiderme appelée hyphopode. Les cellules végétales réorganisent leur cytosquelette et forment un système membranaire de pré-pénétration (PPA) pour («prepenetration apparatus»), qui va permettre au champignon d'entrer dans la racine et d'atteindre la zone corticale de la racine pour y développer des structures hyper-ramifiées appelées arbuscules (Figure 7), lieu d'échanges entre les partenaires (Genre *et al.*, 2005, 2008). Ces structures (Figure 8) sont entourées d'une

membrane plasmique péri-arbusculaire séparant le champignon du cytoplasme végétal et assurant les échanges entre le champignon et la plante grâce à des transporteurs spécifiques (Paszkowski, 2006; Bonfante et Genre, 2010). Les arbuscules ont une durée de vie limitée estimée en moyenne à 8,5 jours (Javot *et al.*, 2007a). Actifs pendant 4 à 5 jours (Taylor, 2010; Kobae et Hata, 2010), les arbuscules entrent ensuite en sénescence et sont complètement éliminées de la cellule végétale qui retrouve son état initial (Javot *et al.*, 2007a). Un grand nombre d'espèces de CMA, comme *R. irregularis*, produisent également des vésicules (Figure 7) qui sont des structures de réserves lipidiques localisées à l'intérieur des cellules racinaires ou au niveau de l'apoplasme (Smith et Read, 2008).

De manière concomitante au développement dans la racine, le champignon va se développer dans le sol. Le mycélium extra-racinaire s'organise en un réseau très dense d'hyphes, qui peut former jusqu'à plusieurs mètres d'hyphes par cm³ de sol (Miller *et al.*, 1995). Ces structures vont puiser eau et sels minéraux puis les transporter vers la racine. C'est aussi à ce moment-là que le champignon va former de nouvelles spores, structures de reproduction et de dissémination des CMA, complétant ainsi son cycle de vie.

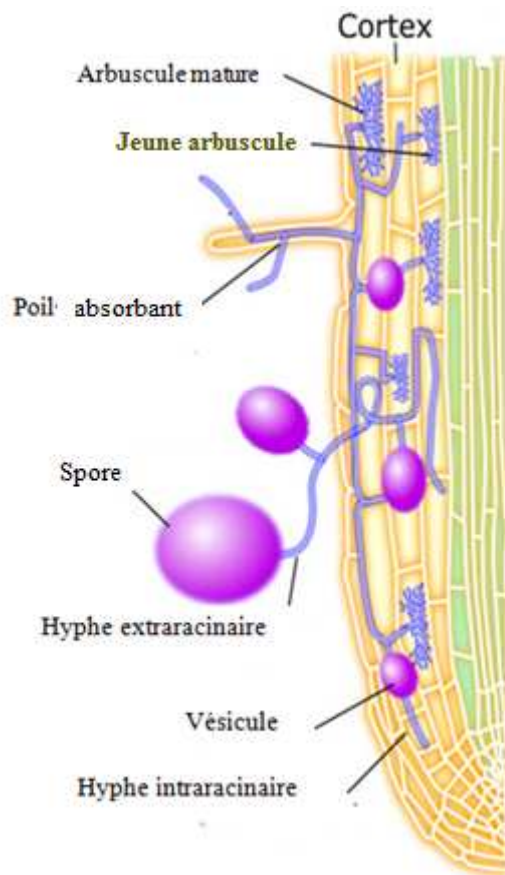


Figure 7: Structures intra et extraracinaires du champignon mycorhizien arbusculaire (www.heartspring.net)

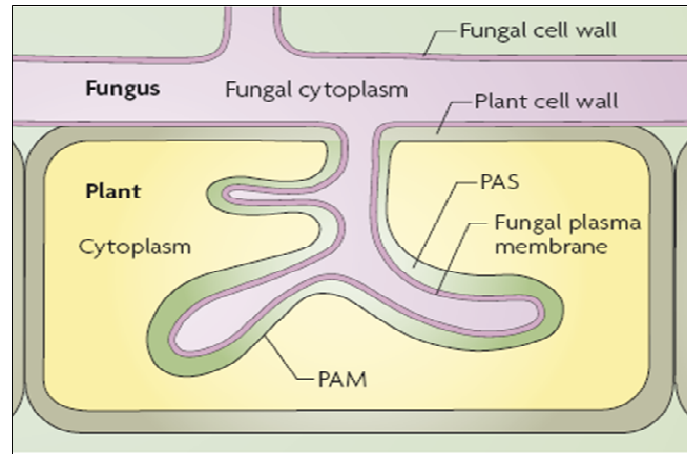


Figure 8: Schéma d'une cellule corticale contenant un arbuscule. Chaque ramification fongique à l'intérieur de la cellule végétale est entourée par une membrane péri-arbusculaire dérivée de la plante (PAM). Elle exclut le champignon du cytoplasme végétal. L'interface apoplasmique entre la membrane plasmique du champignon et la PAM est appelée l'espace péri-arbusculaire (PAS), qui comprend à la fois le matériel de la paroi cellulaire fongique et végétale (Parniske, 2008)

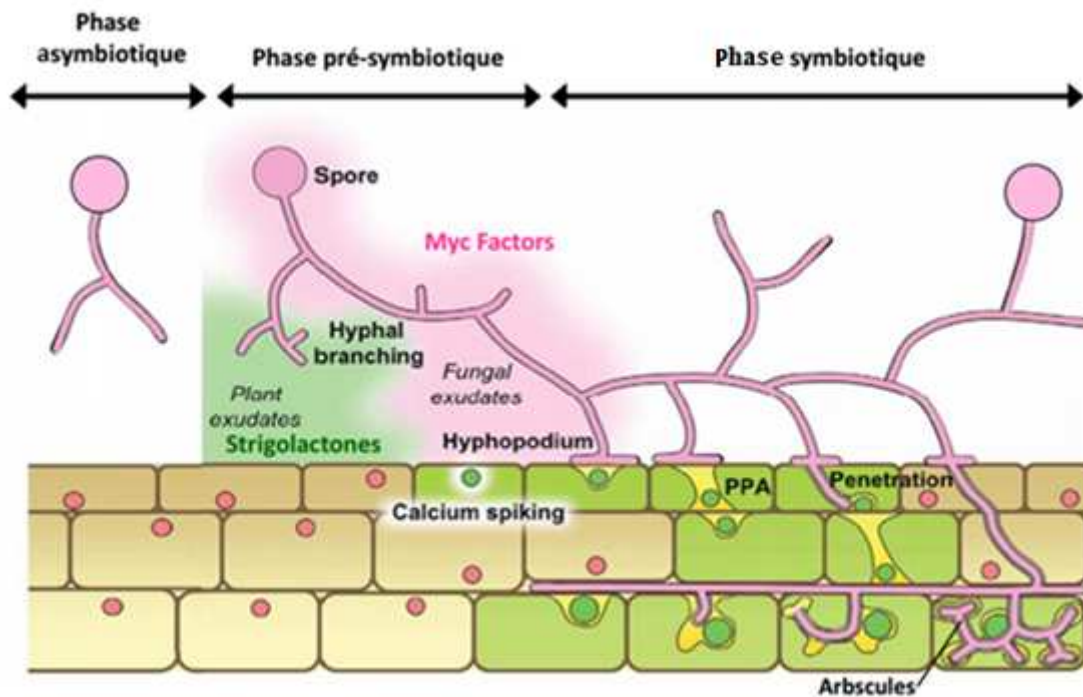


Figure 9: Les différentes phases d'établissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire, adapté d'après Bonfante et Genre (2010). PPA: prepenetration apparatus

IV. Impact des pratiques agricoles sur les CMA

IV. 1. Labours

Les labours font partie des pratiques agricoles modernes et peuvent modifier les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. Plusieurs études ont montré que la perturbation du sol du fait du labourage entraîne, par exemple une réduction de la colonisation des CMA. De plus, les hyphes extraracinaires des CMA produisent de la glomaline, une glycoprotéine, qui permet de stabiliser la structure physique du sol (Rillig, 2004). Les labours auraient donc une double conséquence, d'une part la rupture de la structure physique du sol et d'autre part celle du réseau extramatriciel des champignons qui, en étant rompu peut s'avérer moins efficace pour l'absorption du phosphore mais aussi pour coloniser d'autres racines (Douds *et al.*, 1995; Kabir 2005). Cependant McGonigle et Millet (2000) ont montré que lorsque l'inoculum est dense, le labourage n'avait pas d'impact sur la colonisation. Une diminution des labours a montré une augmentation de la colonisation mycorhizienne et de l'apport en nutriment (revue de Gosling *et al.*, 2006).

IV. 2. Rotation des cultures

Les sols agricoles, étant souvent cultivés par une seule culture, ceux-ci présentent une faible diversité en CMA comparés à des sols naturels (Menéndez *et al.*, 2001; revue de Golsing *et al.*, 2006). La rotation des cultures apparaît alors comme un bon moyen pour conserver la diversité fongique indigène des sols agricoles (Douds *et al.*, 1993; Hamel, 1996). Cette diversité pourrait rendre les cultures alors plus tolérantes aux stress (Ellis *et al.*, 1992). L'autre avantage de la rotation est que des plantes différentes ont des besoins différents en éléments minéraux. Cela permet alors au sol de ne pas s'appauvrir. Cependant, le choix des espèces cultivées est très important car la culture d'une plante ne formant pas de symbiose mycorhizienne arbusculaire peut avoir des effets négatifs sur la population des CMA. Celle-ci réduit la quantité de spores et par la même les chances de colonisation des plantes (Hamel, 1996; Duponnois *et al.*, 2001; Plenchette *et al.*, 2004).

IV. 3. Fertilisation

L'apport de fertilisants minéraux solubles augmente instantanément l'offre du sol en éléments biodisponibles pour les cultures. De très nombreuses études ont montré que dans ces conditions, le rôle de la symbiose mycorhizienne est fortement réduit voire supprimé. L'augmentation de la concentration en azote et en phosphore dans la solution

du sol accroît la synthèse protéique et la synthèse des composés phosphorylés par les plantes, ce qui entraîne une diminution de la teneur en sucres solubles dans les racines. Or, cette teneur détermine les possibilités de nutrition de l'association et le taux de colonisation mycorhizienne (Le Tacon et al. 1999). Par contre, les engrais qui libèrent très lentement les nutriments, comme les engrais de ferme (fumier, compost, résidus de culture, bois raméaux fragmentés) ne semblent pas avoir d'effets négatifs sur les CMA, et peuvent même les stimuler (revue de Gosling et al. 2006). Seuls les systèmes de culture à faible niveau d'intrant ou ceux qui n'ont recours qu'à très peu d'engrais minéraux solubles, comme en agriculture biologique, semblent *a priori* stimuler la symbiose à CMA (Wani et al. 1991). L'effet des CMA sur la nutrition des plantes reste d'ailleurs relativement contradictoire (revue de Gosling et al. 2006).

IV. 4. Génétique et géotype

La création d'hybrides a permis d'obtenir de nouvelles variétés végétales. On sélectionne des espèces pouvant se développer aisément sur des sols pauvres. Les CMA perdent ainsi l'un de leur principaux rôles. La sélection de nouvelles lignées de blé a montré que celle-ci avaient perdu certains gènes reliés au mutualisme. Ils semblent moins dépendre de la mycorhization que des lignées plus anciennes (Hetrick *et al.*, 1992). Dans un but de développement durable le croisement de plantes pour obtenir de meilleures symbioses afin d'améliorer l'apport en nutriments et en eau pourraient être envisagées (Meynard et jeuffroy 2002; Rengel 2002).

IV. 5. Pesticides

Les produits phytosanitaires ou pesticides utilisés en agriculture ont pour but de limiter le développement d'organismes pouvant affecter les cultures. Cependant des organismes non-cibles tels que sont les CMA peuvent être affectés par de ces produits (Jalali et Sharma 1993, Calonne *et al.*, 2010, 2012; Campagnac *et al.*, 2008; 2009, 2010). De nombreuses études menées sur divers pesticides et CMA ont montré des résultats assez contradictoires. Certains auteurs ont pu mettre en évidence des effets néfastes que les fongicides inhibiteurs de la voie de biosynthèse pouvaient engendrer (Dodd et Jeffries 1989; Kjoller et Rosendahl 2000; Schweiger *et al.*, 2001). L'application du chlorothalonil sur du riz (*Oryza sativa*) a montré une diminution de la colonisation racinaire par *Glomus mosseae* ainsi qu'une biomasse inférieure pour les plantes mycorhizées comparées aux non-mycorhizées (Zhang *et al.*, 2006). Calonne *et al.* (2011) ont montré que le propiconazole, un fongicide SBI (Sterol Biosynthesis

Inhibitor) a des effets secondaires sur les deux partenaires de la symbiose : *R. irregularis* et les racines de chicorée transformées. Le propiconazole a provoqué une réduction de la longueur de racine de chicorée et leur épaissement. Ces changements morphologiques sont liés à une diminution de la teneur en stérol en affectant sa biosynthèse dans les racines.

D'autres auteurs ont aussi montré que les fongicides pouvaient ne pas avoir d'effets (von Alten *et al.*, 1993; Schweiger et Jakobsen 1998; Schweiger 2000). A l'inverse de certains cas, les fongicides peuvent stimuler la colonisation, l'absorption des éléments nutritifs notamment lorsque les doses sont réduites (Burrows et Ahmed 2007).

V. Les mécanismes de défense induits par le champignon mycorhizien arbusculaire

Certains événements similaires à ceux déclenchés lors des interactions plante-pathogène, ont également été identifiés lors de l'établissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire. Ces événements comprennent la perception du CMA, la transduction du signal et l'activation des gènes de défense chez la plante hôte. Ces mécanismes de défenses augmentent généralement de manière transitoire lors de l'établissement de la symbiose, ce qui semble indiquer l'existence de mécanismes de rétrocontrôle chez les plantes mycorhizées (Kapulnik *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 1998; García-Garrido et Ocampo, 2002; Zamioudis et Pieterse, 2012).

V. 1. Inductions des réactions de défense des plantes pendant les premiers stades de la mycorhization.

Les CMA sécrètent des éliciteurs, pour la chitine, susceptibles d'induire des réactions de défense chez la plante qu'ils colonisent (Salzer et Boller, 2000). Lors de la mise en place de la symbiose mycorhizienne, une augmentation transitoire des formes actives de l'oxygène (FAO) (également appelés ERO pour Espèces Réactives de l'Oxygène), tel que H₂O₂, a été observée dans les racines (Fester et Hause, 2005; Salzer *et al.*, 1999). Les FAO sont décrites pour jouer un rôle très précoce dans la défense et la signalisation lors de la pénétration d'agents pathogènes ou de bactéries symbiotiques (Pauly *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2012). En outre, des nécroses ou une mort cellulaire sont observées lors de la pénétration de *G. margarita* dans les racines de *Medicago sativa* (Douds *et al.*, 1998). Certains CMA peuvent déclencher une réaction d'hypersensibilité-like (Allen *et al.*, 1989) qui se caractérise par un dépôt de callose, une production de protéines PR-1 et de composés phénoliques (Gollotte *et*

al., 1993). Par ailleurs, une augmentation des activités peroxydase et catalase concomitantes à la formation de l'appressorium a été décrite chez le tabac (Blilou *et al.*, 2000a). Une accumulation transitoire d'acide salicylique (AS) durant les premiers stades de l'inoculation a également été observée dans l'interaction entre le riz et *F. mosseae* (Blilou *et al.*, 2000b). Dans ce cas, l'accumulation de l'AS est également corrélée avec une sur-expression des gènes codant pour les LTP (Lipid transfer protein) et la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (Blilou *et al.*, 2000b).

V. 2. Réactions de défense dans les cellules végétales contenant des arbuscules

Lorsque l'établissement de la symbiose est plus avancé, les réactions de défenses des plantes semblent plus marquées et localisées principalement dans les cellules corticales qui contiennent les structures fongiques telles que les arbuscules (García-Garrido et Ocampo, 2002). Dans ces cellules, une expression localisée de gènes codant pour des glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP) (Balestrini *et al.*, 1997; Blee et Anderson, 2000), les enzymes impliquées dans la voie des phénylpropanoïdes (PAL et chalcone isomerase) (Volpin *et al.*, 1994, 1995; Harrison et Dixon, 1993, 1994), celles impliquées dans le métabolisme des FAO (catalase et peroxydase) (Blee et Anderson, 2000) et des hydrolases (Lambais et Mehdy, 1993, 1998; Blee et Anderson, 1996; David *et al.*, 1998; Salzer *et al.*, 2000) a été observée. Blee et Anderson (2000) suggèrent que les catalase et peroxydase jouent un rôle dans le catabolisme de l'H₂O₂ et/ou dans des réactions entre les protéines et les polysaccharides dans l'interface entre les arbuscules et la membrane plasmique de la cellule végétale.

Une surexpression de gènes codant pour des chitinases et β -1,3-glucanases a également été observée au niveau des cellules corticales contenant des arbuscules chez diverses espèces végétales (*Phaseolus vulgaris* L., *Nicotiana tabacum*, *Medicago truncatula*) (Lambais et Mehdy, 1993, 1998; Blee et Anderson, 1996; David *et al.*, 1998; Salzer *et al.*, 2000). Ces inductions suggéreraient un rôle de ces enzymes dans le contrôle de la colonisation de la plante par le champignon. Salzer *et al.*, (2000) suggèrent que les gènes de la chitinase jouent un rôle dans la suppression des réactions de défense des plantes dans les derniers stades de la mycorhization.

Un des mécanismes pouvant intervenir dans l'atténuation des réactions de défense de la plante lors de la symbiose mycorhizienne arbusculaire, serait la dégradation des éliciteurs exogènes produits par les CMA et/ou l'arrêt de la libération d'éliciteurs endogènes issus de la

dégradation de la paroi cellulaire des plantes. Les hydrolases végétales vont avoir pour rôle la dégradation des exoéliciteurs d'origine fongiques, alors que les hydrolases fongiques interviennent en hydrolysant les composants de la paroi cellulaire des plantes.

V. 3. Régulation des réactions de défense chez les plantes au cours de la symbiose mycorhizienne arbusculaire par des altérations de la voie de transduction du signal

Un autre des mécanismes intervenant dans l'atténuation de la réaction de défense chez la plante pourrait être le blocage de composants intervenant dans la voie de transduction de signaux. Parmi ces composants, l'AS et les FAO sont considérés comme des messagers secondaires lors de l'association mycorhizienne arbusculaire (Garcia-Garrido et Ocampo, 2002). Au cours de la colonisation mycorhizienne, l'accumulation d' H_2O_2 montré par la coloration du DAB augmente dans les cellules arbusculaires (Salzer *et al.*, 1999), parallèlement à une modification du niveau d'activité d'enzymes anti-oxydantes comme les activités peroxydases ou catalase (Blilou *et al.*, 2000a; Lambais, 2000). Ces résultats suggèrent des modifications du métabolisme des FAO au cours de la colonisation. Ainsi une modification de la régulation des activités peroxydase et catalase a été montrée chez le haricot et le blé colonisé par *R. irregularis* (Blee et Anderson, 2000). Par ailleurs, une superoxyde dismutase (SOD) fonctionnelle exprimée dès les stades précoces d'infection a été caractérisée chez *Gigaspora margarita*, (Lanfranco *et al.*, 2005). Cette enzyme, dégradant les FAO en particulier l' H_2O_2 , participerait à la résistance du champignon lors de « bursts » oxydatifs.

V. 4. Régulation des réactions de défense des plantes par des hormones et des nutriments pendant la mycorhization

Des régulations hormonales et nutritionnelles des plantes peuvent générer des signaux cellulaires en modifiant les réactions de défense de la plante pendant le développement de la symbiose mycorhizienne (Garcia-Garrido et Ocampo, 2002). Dans le cas de l'interaction avec le CMA, il est admis qu'il existe une corrélation inverse entre la colonisation des racines avec le CMA et les niveaux de l'éthylène et l'AS (Blilou *et al.*, 1999; Herrera-Medina *et al.*, 2007; Riedel *et al.*, 2008). L'acide jasmonique (AJ) et ses dérivés ont également reçu une attention particulière car ils sont connus pour jouer un rôle majeur dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Toutefois, les données expérimentales sont très controversées (Gutjahr et Paszkowski, 2009; Hause et Schaarschmidt, 2009). Des niveaux élevés d'AJ chez les plantes mycorhizées par rapport aux témoins ont été décrits chez la luzerne (Hause *et al.*, 2002; Meixner *et al.*, 2005), la tomate, le soja et le maïs (López-Ráez *et al.*, 2010; Nair *et al.*, 2015;

Fernández *et al.*, 2014), alors qu'ils sont demeurés inchangés chez *Nicotiana attenuata* (Riedel *et al.*, 2008). Ces régulations hormonales pourraient dépendre de l'espèce fongique et du partenaire végétal (López-Ráez *et al.*, 2010; Nair *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2014). Par ailleurs, une protéine SP7 sécrétée par *R. irregularis* et transférée dans la cellule végétale par le champignon interagirait avec le facteur de transcription ERF19 (un facteur de transcription induit en réponse aux applications d'éthylène, potentiellement impliqué dans la régulation du système immunitaire de plante) modulant ainsi l'accommodation du symbiote dans la racine (Kloppholz *et al.*, 2011). Une corrélation positive entre l'ABA et l'établissement de la symbiose a été mise en évidence, l'ABA semble jouer un rôle important dans le développement des arbuscules et dans leur fonctionnement (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Un schéma hypothétique des mécanismes de régulation impliqués dans les réactions de défense de la plante lors de l'établissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire a été proposé par Garcia-Garrido et Ocampo (2002) (Figure 10).

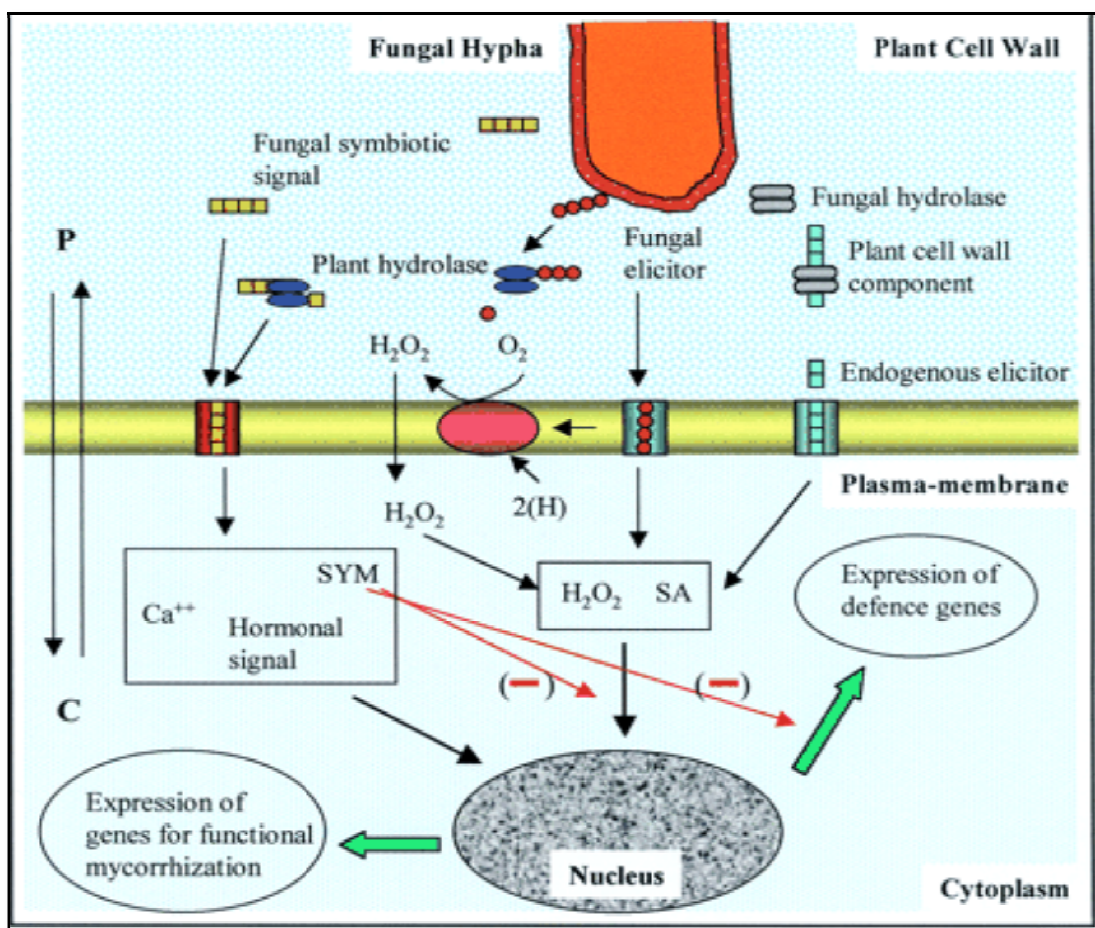


Figure 10: Modèle hypothétique représentant les mécanismes de régulation impliqués dans les réactions de défense de la plante lors de l'établissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire (Garcia-Garrido et Ocampo, 2002)

VI. Bénéfices de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

L'interaction mycorhizienne se caractérise par un transfert bi-directionnel de nutriments. En échange du carbone fourni par la plante, les CMA améliorent la nutrition hydrique et minérale de la plante, notamment en phosphore et en azote (Figure 11). Ces échanges nutritionnels sont au centre de l'association mycorhizienne et agissent en tant que régulateurs de la symbiose (Jakobsen, 1995; Fitter, 2006; Javot *et al.*, 2007). En effet, pour éviter qu'un partenaire prenne l'avantage sur l'autre, comme c'est le cas pour le parasitisme, une régulation fine des échanges et de l'invasion des tissus de la plante par le champignon est mise en place (Kiers *et al.*, 2011; Balzergue *et al.*, 2011).

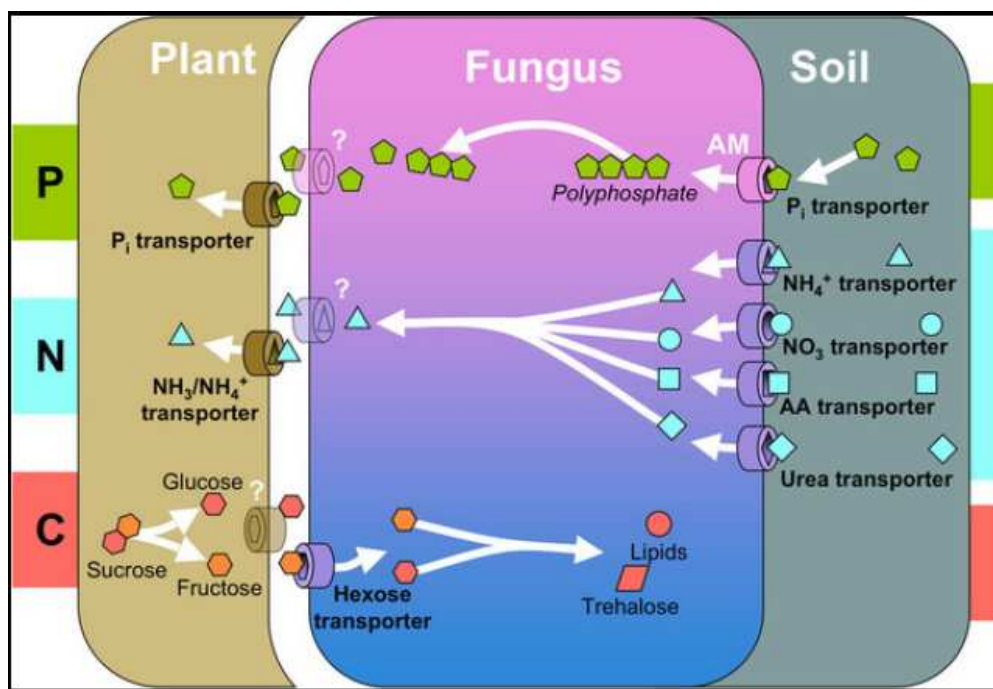


Figure 11: Processus d'échanges de nutriments [phosphore (P), azote (N) et carbone (C)] dans l'ensemble des symbioses mycorhiziennes (d'après Bonfante et Genre, 2010)

VI. 1. Bénéfices pour le CMA :

Les CMA reçoivent de la plante des éléments carbonés issus de la photosynthèse. L'interaction représente donc un coût pour le partenaire végétal. La part de photosynthétats transférée au champignon est non négligeable puisqu'elle peut atteindre jusqu'à 20 % du carbone fixé lors de la photosynthèse (Wright *et al.*, 1998 ; Bago *et al.*, 2000). Celui-ci est transporté jusqu'aux racines sous la forme de saccharose et de monosaccharides comme le glucose, le fructose et le mannose. Avant le transport à travers la membrane plasmique végétale, le saccharose doit être clivé par une invertase d'origine végétale induisant la production de glucose et de fructose (Schaarschmidt *et al.*, 2006). Les hexoses seraient

ensuite transportés à travers la membrane plasmique végétale jusque l'interface symbiotique via un transport passif (Schaarschmidt *et al.*, 2007). Ces hexoses sont importés dans le champignon à partir de l'apoplasme via des transporteurs fongiques spécifiques. Le premier transporteur MST1 (monosaccharide transporter 1) identifié chez *Geosyphon pyriformis* est localisé sur la membrane plasmique et permettrait le transport des hexoses, préférentiellement sous la forme de glucose et de mannose (Schüßler *et al.*, 2006, 2007). Récemment, les travaux de Helber *et al.* (2011) ont montré qu'un gène fongique (*GiSUC1*) possède également une forte similarité avec la séquence d'un transporteur de saccharose alors que celui-ci n'est généralement pas considéré comme étant prélevé par le CMA (Doidy *et al.*, 2012). Par ailleurs, un gène *MST2*, hautement exprimé durant la symbiose et à peine détecté durant les autres phases du cycle de développement du CMA chez *R. irregularis*, pourrait être impliqué dans le prélèvement de glucides d'origine végétale (Helber *et al.*, 2011). Helber *et al.* (2011) ont également démontré que ce gène était exprimé non seulement dans les arbuscules mais également dans les hyphes intercellulaires, suggérant que ces structures soient également le site de prélèvement des glucides. Les hexoses sont ensuite convertis en tréhalose, glycogène et lipides qui seront ensuite distribués dans les parties extra-racinaires du CMA (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 1999; Bago *et al.*, 2000).

VI. 2. Bénéfices pour la plante

VI. 2. 1. Bénéfices trophiques

Le rôle majeur des CMA est l'amélioration des nutriments hydrique et minérale de la plante. Le phosphore (Helgason et Fitter, 2005; Feddermann *et al.*, 2010), l'azote (Tanaka et Yano, 2005, Leigh *et al.*, 2009) et d'autres cations essentiels tels que le zinc, le cuivre, le manganèse et le fer (Liu *et al.*, 2000) sont prélevés dans le sol par les structures extraracinaires fongiques et transportés jusqu'aux racines de la plante. Il en résulte une amélioration de la croissance des plantes mycorhizées (Sharifi *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 2008; Zuccarini et Okurozka, 2008).

VI. 2. 1. 1. La nutrition hydrique

Les CMA contribuent à la résistance des plantes à la sécheresse (Augé, 2001; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2010). Globalement, les mécanismes impliqués dans la protection des plantes mycorhizées face au stress hydrique seraient liés à une meilleure nutrition phosphatée qui améliore la photosynthèse et accroît la biomasse de la plante, mais aussi à un meilleur accès à l'eau du sol et au maintien de l'équilibre hydrique dans la plante (Augé, 2001). En effet, l'acquisition de l'eau chez les CMA se fait d'une part par simple diffusion à travers la

membrane plasmique et d'autre part, plus efficacement, grâce à l'implication d'aquaporines. Une première aquaporine putative a été détectée chez *R. irregularis* (GinAQP1) et son expression est induite en réponse à la sécheresse et au stress froid (Aroca *et al.*, 2009). Deux autres aquaporines fonctionnelles, GintAQP1 et GinAQP2, induites dans la plante en réponse à la sécheresse ont également été décrites récemment (Li *et al.*, 2013).

VI. 2. 1. 2. Le Phosphore (P)

L'amélioration de la nutrition phosphatée est considérée comme l'avantage principal apporté par la symbiose mycorhizienne à arbuscule (Smith *et al.*, 2003). L'efficacité du champignon à acquérir le phosphore tient à sa capacité d'exploration du sol et à ses aptitudes métaboliques. En effet, l'élongation des hyphes extra-racinaires augmente la surface d'échange entre les minéraux du sol et la racine. Il est estimé que la longueur des hyphes fongiques peut atteindre 81 à 111 m par cm³ de sol (Miller *et al.*, 1995). Ils peuvent ainsi explorer des zones non accessibles pour les plantes afin d'y prélever les éléments minéraux et l'eau et les transférer à la plante hôte (Marulanda *et al.*, 2003; Khalvati *et al.*, 2005; Bolandnazar *et al.*, 2007). D'autre part, le CMA possède des phosphatases alcalines qui vont cliver des substrats présents dans le sol et rendre le phosphate accessible (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi, 1978; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1979; Liu *et al.*, 2013). L'importation du P du sol est effectuée par des transporteurs fortement exprimés dans les hyphes extra-racinaires (Harrison et van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005). Le phosphate est ensuite converti en polyphosphate (entre 3 et des milliers de molécules de phosphate) qui est transporté vers les hyphes intra-racinaires. Le polyphosphate est alors hydrolysé, afin d'être transporté dans la plante, via notamment des transporteurs spécifiques (Pumplin *et al.*, 2012). Il existe une corrélation négative entre la concentration de phosphate dans le sol et le niveau de colonisation mycorhizienne des racines de la plante. Le phosphore en excès agirait notamment en diminuant la formation des hyphopodes via un signal encore non identifié (Balzergue *et al.*, 2011). Lorsque le transporteur de phosphate végétal spécifique de la symbiose est muté la colonisation est fortement diminuée (Maeda *et al.*, 2006; Javot *et al.*, 2007). A l'inverse, quand le transport de carbone alloué au symbiote est diminué, le champignon va accumuler le phosphate (Hammer *et al.*, 2011).

Le phosphore est un élément indispensable à la vie de la plante (Figure 12). Il favorise la croissance de la plante et influe notamment sur le nombre de feuilles et de tiges (Zafar Ullah, 2003). Il participe également au développement racinaire des plantes. (Marschner, 1995). Au niveau cellulaire, ce composé entre dans la synthèse de nombreuses molécules telles que l'adénosine triphosphate (ATP) et les nucléotides (unité de base des acides

nucléique); des phospholipides membranaires; certaines enzymes et co-enzymes (Marschner, 1995; Gaude *et al.*, 2008; revue de Maathuis, 2009). Le phosphore est également stocké dans les vacuoles sous forme d'inositol-hexa-phosphate appelé aussi les acides phytiques (phytates) qui sont d'excellents chélateurs des cations tels que le Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} et Zn^{2+} (Mitsubishi *et al.*, 2005).

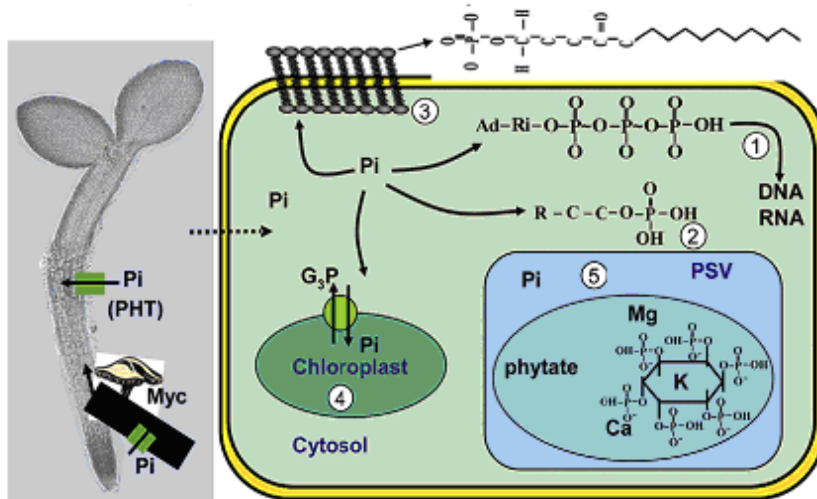


Figure 12: Principales structures cellulaires dans lesquelles le phosphore est incorporé chez les plantes. Le phosphore est absorbé sous la forme inorganique: PO_4^{3-} (Pi) grâce à des transporteurs ayant une forte affinité aux ions H^+ . Le Pi forme les pyrophosphates hautement énergétiques (1) et les liaisons esters (2). Les groupes phosphates forment les composants lipophiles de plusieurs lipides membranaires (3). Le Pi dans les chloroplastes est nécessaire pour la photosynthèse (4). Il passe dans le chloroplaste en échange avec le glycéraldéhyde-3-phosphate (G_3P). Dans les tissus de stockage (5), le Pi est séquestré dans les vacuoles de stockage des protéines sous forme de phytate lié aux minéraux (d'après Maathuis, 2009)

VI. 2. 1. 3. L'azote (N)

Comme le phosphore, l'azote est un composant vital pour le CMA et la plante. Il entre dans la formation des phospholipides, des coenzymes et des acides aminés. L'azote est présent sous deux formes dans le sol: organique et minérale (nitrites, nitrates et ions ammonium). Le CMA est capable de prélever l'azote préférentiellement sous forme d'ions ammonium (NH_4^+) (Johansen *et al.*, 1996) mais également et dans une moindre mesure sous la forme de nitrates (NO_3^-) (Bago *et al.*, 1996; Johansen *et al.*, 1996) ou d'acides aminés (Hawkins *et al.*, 2000; López-Pedrosa *et al.*, 2006).

L'acquisition de l'azote nécessite l'activité de transporteurs localisés au niveau de l'interface sol/hyphes extra-racinaires du CMA. Deux gènes codant pour des transporteurs de

haute-affinité aux ions NH_4^+ ont été identifiés chez *R. irregularis*: *GintAMT1* et *GintAMT2* (López-Pedrosa *et al.*, 2006; Pérez-Tienda *et al.*, 2011). *GintAMT1* est préférentiellement exprimé dans le mycélium extra-racinaire lorsque l'azote est présent en faible quantité. *GintAMT1* est plus faiblement exprimé dans les arbuscules suggérant que ce gène soit impliqué dans l'acquisition de l'azote à partir du milieu environnant. En revanche, *GintAMT2* serait impliqué dans la rétention et la récupération des ions NH_4^+ pour les besoins des CMA en N (Pérez-Tienda *et al.*, 2011). Deux autres transporteurs putatifs de nitrate ont été identifiés, le premier semble davantage exprimé dans les structures intra-racinaires, tandis que le second est exprimé dans tous les compartiments fongiques (Tian *et al.*, 2010; Tisserant *et al.*, 2012). Afin d'être assimilé via le cycle GS/GOGAT (glutamine synthétase/glutamate synthase), le nitrate doit être converti en ammonium par des nitrites et nitrates réductases (Marzluf, 1996). *R. irregularis* possède un nitrate réductase et deux nitrites réductases exprimées dans les hyphes extra-racinaires. L'azote est ensuite transporté vers la plante sous forme d'arginine. Afin de transformer l'ammonium en arginine, plusieurs enzymes entrent en jeu: une glutamine synthetase (GS), dont 3 ont été retrouvées chez *R. irregularis* et *F. mosseae* (Breuninger *et al.*, 2004; Govindarajulu *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2010; Tisserant *et al.*, 2012). L'arginine est ensuite hydrolysée par une arginase donnant de l'urée et de l'ornithine (Tian *et al.*, 2010). L'urée serait ensuite retransformée en ammonium par une uréase (GiURE) alors que l'ornithine serait transformée soit en glutamate par une ornithine aminotransférase, soit en putrescine par une ornithine décarboxylase (Tian *et al.*, 2010; Tisserant *et al.*, 2012). Par ailleurs, un transporteur d'ammonium (AMT) a été identifié chez *Lotus japonicus*, dans les cellules contenant les arbuscules (Guether *et al.*, 2009a,b) et la régulation d'un transporteur d'ammonium chez *Medicago truncatula* mycorhizé a également été démontrée (Gomez *et al.*, 2009).

VI. 2. 1. 4. Les oligo-éléments

Les oligo-éléments sont impliqués dans de nombreuses activités enzymatiques intervenant notamment dans la photosynthèse, la respiration oxydative, la protection contre les radicaux libres ou encore la biosynthèse des lipides (Fraústro Da Silva et Williams, 2001). Le CMA permet une meilleure absorption des oligo-éléments peu mobiles dans les sols, tels que le Cu, le Zn, le Fe, le Mn et le Co. En effet, deux fois plus de Zn, Fe et Mn et trois fois plus de Cu sont mesurés chez les plantes d'arachides inoculées par *Glomus fasciculatum* (Krishna et Bagyaraj, 1984). Cette capacité à augmenter la concentration du Zn, Cu et Fe dans les parties aériennes de maïs colonisé par *R. irregularis* par rapport aux plantes non-

mycorhizées a également été observée quand ces micro-éléments étaient présents en faibles quantités dans le sol (Liu *et al.*, 2000).

VI. 2. 2. Autres bénéfiques :

- Biostabilisation

Le réseau mycélien des CMA intervient sur la macroaggrégation des constituants du sol et donc sur sa stabilité (Tisdall, 1991). Les hyphes libèrent dans le sol la glomaline, une glycoprotéine qui permet la formation des macroaggrégats stables (Tisdall, 1994). Cette stabilité du sol permet de lutter contre l'érosion, mais aussi la perte de nutriments et de la matière organique par lixiviation des sols, ce qui permet de maintenir une productivité intéressante des sols cultivés (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995).

- Biofertilisation

Il y a un grand intérêt à étudier et à utiliser les CMA en agriculture en tant que biofertilisants (Sadhana, 2014). Leur application à grande échelle permet de réduire l'utilisation et la dépendance des fertilisants chimiques. Ceci est une conséquence de l'amélioration de la quantité des éléments minéraux du sol assimilés par les plantes mycorhizées, conduisant à une croissance accrue des plantes (Abbott et Robson, 1991a).

- Résistance aux stress

➤ abiotiques

La mycorhization permet aussi une meilleure résistance des plantes aux stress abiotiques: sécheresse, froid, salinité, pollution ou même températures extrêmes (Aroca *et al.*, 2007; Hildebrandt *et al.*, 2007; Bunn *et al.*, 2009; Debiante *et al.*, 2008; 2009; Lazcano *et al.*, 2014). Une meilleure croissance des plantes mycorhizées a été observée dans des conditions de sécheresse, de salinité et sur des milieux contaminés par divers polluants (Auge, 2001; Porcel *et al.*, 2012; Ferrol *et al.*, 2009) suggérant un effet protecteur de la mycorhization contre les stress abiotiques. La tolérance des plantes mycorhizées à ces différents stress abiotiques serait attribuée à un ensemble de processus physiologiques dont, une meilleure nutrition minérale et hydrique conduisant à un meilleur développement de la plante (Augé, 2001). Il a été rapporté que la protection des plantes par la mycorhization contre le stress salin, par exemple, résulterait d'une augmentation et/ou d'une meilleure sélection dans le

prélèvement des nutriments, de l'accumulation de composés osmoregulateurs, d'une importante conductance stomatique, d'une augmentation de l'activité photosynthétique ou encore d'une limitation de la déshydratation des feuilles (Feng *et al.*, 2002; Aroca *et al.*, 2006; Porcel *et al.*, 2006). L'accumulation de K^+ par les plantes mycorhizées aide, également, au maintien d'un ratio K/Na élevé, prévenant ainsi la perturbation de nombreux processus enzymatiques et l'inhibition de la synthèse protéique en condition de stress salin (Porcel *et al.*, 2012). De plus, une accumulation plus élevée de proline, de bétaïne et de glucides solubles a été décrite chez les plantes mycorhizées (Porcel *et al.*, 2004). Ces molécules sont connues pour protéger les structures subcellulaires, pour maintenir les activités enzymatiques et limiter les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres en condition de stress (Yokoi *et al.*, 2002).

Quant à la survie des plantes mycorhizées par des CMA dans des milieux pollués, une plus faible accumulation des polluants dans ces plantes ou une diminution de leur transport des racines vers les parties aériennes peuvent être à l'origine de cet effet protecteur. Il a été démontré que les éléments traces métalliques, par exemple, étaient séquestrés dans les vacuoles et les parois fongiques, préservant ainsi les tissus végétaux. (Rivera-Becerril *et al.*, 2002; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2008). Une accumulation des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les hyphes et les spores des CMA a été également observée par Verdin *et al.* (2006).

D'une façon générale, il a été suggéré que la symbiose mycorhizienne arbusculaires diminuerait les effets de divers stress abiotiques chez les plantes en atténuant le stress oxydant par induction de systèmes anti-oxydants enzymatiques (superoxyde dismutase, ascorbate-peroxydase, guaicol-peroxydase, catalase) et non enzymatiques (ascorbate et glutathion) (Campagnac *et al.*, 2010; Debiane *et al.*, 2009; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2010). Ces systèmes antioxydants permettent l'élimination des espèces réactives de l'oxygène générées en condition de stress et par conséquent, la protection des lipides membranaires et de l'ADN contre les dommages oxydatifs. Au niveau moléculaire, le rôle joué par les CMA consisterait en une régulation de l'expression de certains gènes chez la plante hôte impliqués dans la tolérance aux polluants et /ou dans la détoxification (Repetto *et al.*, 2003; Rivera-Becerril *et al.*, 2005).

➤ **biotiques**

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser les CMA comme agent de biocontrôle contre les agents phytopathogènes (Sharma et Adholeya 2000; Harrier and Watson 2004; Whipps 2004; Mukerji et Ciancio, 2007) (Tableau 1)

Les plantes mycorhizées sont plus résistantes à plusieurs agents pathogènes racinaires et quelques agents pathogènes foliaires (Whipps, 2004; Pozo *et al.*, 2013). L'établissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire entraîne des changements remarquables dans la physiologie de la plante hôte. Ces changements vont des modifications dans l'équilibre hormonal et le profil transcriptionnel jusqu'aux modifications au niveau des métabolismes primaires (synthèse des acides aminés et des acides gras) et secondaires (modifications synthèse de flavonoïdes et l'apocaroténoïdes) (Hause *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Schliemann *et al.*, 2008; López-Ráez *et al.*, 2010).

Cette protection apportée par la colonisation mycorhizienne résulterait d'une combinaison de:

- La stimulation de la croissance de la plante par une meilleure nutrition et la compensation par la symbiose des dommages causés par l'agent phytopathogène (revue de Whipps, 2004; Dalpé, 2005; revue de Pozo *et al.*, 2013; Wehner *et al.*, 2010).
- La compétition directe entre les CMA et les organismes phytopathogènes liées à la disponibilité des nutriments, notamment des photosynthétats et des sites d'infection sur la racine (Cordier *et al.*, 1998; revue de Whipps, 2004; Dalpé, 2005; Pozo *et al.*, 2013; Wehner *et al.*, 2010).
- La transformation morphologique et architecturale de la racine peut également freiner la dynamique infectieuse du pathogène, bien que la preuve d'une corrélation ne soit pas toujours mise en évidence à ce jour (Tawarayama, 2003; revue de Whipps, 2004; Dalpé, 2005; Pozo *et al.*, 2009; Wehner *et al.*, 2010). De plus, les CMA induisent la formation de racines latérales plus épaisses (Matsubara *et al.*, 1995).
- La modification de la microflore et de l'augmentation du taux de matière organique dans les sols. La colonisation par le CMA peut conduire à une évolution de la qualité et la quantité des exsudats racinaires (Sood, 2003; Pivato *et al.*, 2008). Ces changements peuvent stimuler la synthèse de composés produits par la microflore ayant une activité antagoniste vis-à-vis de certains pathogènes racinaires (Barea *et al.*, 2005; revue de Dalpé, 2005; Pozo *et al.*, 2009; Wehner *et al.*, 2010; Badri et Vivanco 2009; Jung *et al.*, 2012). Les travaux de Siasou *et al.* (2009) ont montré qu'une bactérie rhizosphérique telle que *Pseudomonas fluorescens* peut conférer une protection chez les plantes, notamment lorsqu'elles sont mycorhizées par *R. irregularis*, contre *Gaeumannomyces graminis*, l'agent causal du Piétin, en synthétisant un antibiotique, le 2,4-diacetylphloroglucinol.

➤ L'induction ou la suppression de certains mécanismes de défense des plantes, notamment les mécanismes enzymatiques (revue de Dalpé, 2005; Pozo et Azcón-Aguilar, 2007; Pozo *et al.*, 2009; Wehner *et al.*, 2010). En effet, la protection par la mycorhization contre les parasites racinaires a été associée à l'accumulation de phénols, de FAO, de phytoalexines et l'induction de l'activité d'enzymes hydrolytiques telles que les chitinases et les β -1,3-glucanases dans les racines mycorhizées (Cordier *et al.*, 1998; Dumas-Gaudot *et al.*, 2000; Pozo *et al.*, 1999, 2002, 2009; Yao *et al.*, 2003; Zhu et Yao, 2004; Li *et al.*, 2006). La protection conférée par l'association mycorhizienne aux plantes contre le nématode *Meloidogyne incognita* a été associée à l'expression d'un gène codant pour une chitinase, *VCH3*, exprimé dans tout le système racinaire (Li *et al.*, 2006). Enfin, l'accumulation de protéines de défense, notamment des protéines PR et l'implication des voies de signalisation de l'AJ, de l'ET et de l'AS, connus pour jouer un rôle majeur dans la régulation des mécanismes de défense des plantes, semblent être à l'origine de ces processus de protection (revue de Van Wees *et al.*, 2008).

Contrairement aux maladies racinaires, peu de travaux ont été menés sur la protection conférée par les CMA sur les maladies foliaires et les résultats sont moins concluants et souvent contradictoires (revue de Pozo, 2013). L'efficacité de la protection induite par la symbiose mycorhizienne semble être fortement dépendante du mode de vie du pathogène ciblé (biotrophie, hémibiotrophie ou nécrotrophie) (Pozo et Azcón-Aguilar, 2007; Jung *et al.*, 2012). Ainsi, les premières études ont rapporté une plus grande sensibilité des plantes mycorhizées aux virus (Gernns *et al.*, 2001; Whipps, 2004). En ce qui concerne les agents pathogènes hémibiotrophes, la symbiose mycorhizienne n'induit pas toujours une protection (Chandanie *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005; Campos-Soriano *et al.*, 2012). En revanche, plusieurs études mettent en évidence l'effet protecteur de la symbiose mycorhizienne contre les pathogènes foliaires nécrotrophes (Fritz *et al.*, 2006; De la Noval *et al.*, 2007; Pozo *et al.*, 2013).

Le tableau 1 répertorie les différentes études portant sur l'effet protecteur des CMA contre les maladies racinaires, foliaires et les mécanismes de défense potentiellement impliqués.

Tableau 1: Tableau récapitulatif de l'effet de la colonisation mycorhizienne à arbuscules sur (a) les agents phytopathogènes racinaires et (b) aériens. (nd): non défini, (+) : effet positive, (-) : effet négative et (Ø) : Absence d'effet.

a- Agent pathogène racinaire		Nom de la maladie racinaire	Plante hôte	CMA	Effet	Mécanismes de défense induits par la mycorhization	Référence
Nématode	<i>Meloidogyne incognita</i>		Trèfle blanc <i>Trifolium repens</i>	<i>Glomus aggregatum</i> <i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Funneliformis mosseae</i>	+	nd	Habte, 1999
	<i>Meloidogyne incognita</i>		Papaya <i>Carica papaya</i>	<i>Funneliformis mosseae</i> <i>G. manihotis</i> <i>Bacillus</i> sp	+	nd	Jaizme-Vega et al., 2006
	<i>Meloidogyne incognita</i>		Vigne <i>Vitis amurensis</i>	<i>Glomus versiforme</i>	+	Surexpression d'un gène codant pour une chitinase <i>VCH3</i>	Li et al., 2006
	<i>Meloidogyne incognita</i> <i>Macrophomina phaseolina</i>		Pois de chiche <i>Cicer</i> sp.	<i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Rhizobium</i> sp. <i>Pseudomonas striata</i>	+	nd	Akhtar et al., 2008
	<i>Radopholus similis</i> et <i>Pratylenchus coffeae</i>		Banane <i>Musa</i> sp.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	nd	Elsen et al., 2008
	<i>Xiphinema index</i>		Vigne <i>Vitis vinifera</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	Surexpression des gènes codant pour <i>CHI</i> 1b, <i>GST</i> , <i>PR10</i> , stilbene synthase 1 e 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (Phénomène de priming)	Hao et al., 2012
Champignon	<i>Pyrenochaeta terrestris</i>	Maladie de la racine rose (phoma)	Oignon <i>Allium cepa</i>	<i>Glomus caledonium</i>	+	nd	Safir, 1968
	<i>Verticillium dahliae</i>	Verticilliose	Coton <i>Gossypium</i> sp.	<i>Glomus fasciculatus</i>	-	nd	Davis, 1979
	<i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>chrysanthemi</i>	Fusariose	Carotte <i>Daucus carota</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	Accumulation de transcrits de gnes codant pour des chitinases	Benhamou, 1994
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Fusariose	Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	nd	Caron, 1986a
	<i>Verticillium dahliae</i>	Verticilliose	Aubergine (<i>Solanum melongena</i>) Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	nd	Karagiannidis et al., 2002
	<i>Verticillium dahliae</i>	Verticilliose	Poivre <i>Capsicum annuum</i> cv. <i>Piquillo</i>	<i>Funneliformis mosseae</i> <i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Glomus deserticola</i>	+	nd	Garmendia et al., 2004
	<i>Fusariumculmorum</i>	Fusariose	Orge <i>Hordeum vulgare</i>	<i>Piriformospora indica</i>	-	nd	Waller et al., 2005
	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Piétin-échaudage	Orge <i>Hordeum vulgare</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	Augmentation de l' AS-résistance indépendante	Khaosaad, et al., 2007

Suite tableau 1							
Champignon	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctone brun	Haricot <i>Phaseolus vulgaris L.</i>	<i>Funneliformis mosseae</i> <i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Glomus clarum</i>	+	Production des composés phénoliques. Augmentation des activités polyphenol oxidase et PAL Défense physique au niveau de la paroi cellulaire	Abdel-Fattah <i>et al.</i> , 2010
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctone brun	Maïs <i>Zea mays</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	Priming Surexpression des gènes de défense <i>PR2a</i> , <i>PAL</i> , <i>AOS</i> et <i>BX9</i> Amélioration de la production de benzoxazinoïdes, (composé chimique joue un rôle dans la défense des plantes)	Song <i>et al.</i> , 2011
	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Piétin- échaudage	Orge <i>Hordeum vulgare</i>	<i>Funneliformis mosseae</i> <i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Gigaspora rosea</i>	+	Nd	Castellanos- Morales <i>et al.</i> , 2012
	<i>Thielaviopsis basicola</i>	Pourriture noire	Pétunia <i>Petunia hybrida</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	Surexpression des gènes de défense : endochitinase <i>PR3</i> , <i>P450</i> réductase, <i>phLOX2</i> et <i>CHIT1b</i>	Hayek <i>et al.</i> , 2014
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctone brun	Pomme de terre <i>Solanum tuberosum L.</i> , var. <i>Unica</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Pseudomonas sp</i> R4180	+	Surexpression du gène <i>ERF3</i> (éthylène réponse factor 3)	Velivelli <i>et al.</i> , 2015
Chromiste	<i>Phytophthora.parasitica</i>	Maladie du pied noir	Tomate <i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	Epaissement de la paroi cellulaire apparition de papilles Accumulation de protéine codant pour PR-1a dans les parties racinaires (résistance systémique)	Cordier <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Phytophthora. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	Maladie du pied noir	Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Funneliformis mosseae</i> - et <i>Rhizophagus irregularis</i>	+	Augmentation de l'activité spécifique de β -1,3- glucanase	Pozo <i>et al.</i> , 1999
	<i>Phytophthora parasitica</i>	Maladie du pied noir	Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	nd	Vigo, 2000
	<i>Phytophthora parasitica</i>	Maladie du pied noir	Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Funneliformis mosseae</i> <i>Rhizophagus irregularis</i>	+	Stimulation des activités enzymatiques: chitinase, chitosinase, β 1, 3 glucanase et superoxide dismutase	Pozo <i>et al.</i> , 2002
Bactérie	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Rhizoctone brun	Tomate <i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	Lignification au niveau de paroi cellulaire	Tahat, 2012

Suite tableau 1

b- Agents pathogènes affectant les parties aériennes		Nom de la maladie aérienne	Plante hôte	CMA	Effet	Mécanismes de défense	Référence
Champignon	<i>Oidium begoniae</i> Putt.	La maladie du blanc	<i>Begonia hiemalis</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	+	nd	Feldmann, 1998
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i> <i>Oidium lini</i>	Fusariose Oïdium	Lin	<i>Rhizophagus irregularis</i>	-	nd	Dugassa <i>et al.</i> , 1999
	<i>Botrytis cinerea</i>	Pourriture grise	Tabac <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthinc	<i>Rhizophagus irregularis</i>	-	nd	Shaul <i>et al.</i> , 1999
	<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> .	Oïdium	Orge <i>Hordeum vulgare</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	-	nd	Gernns, 2001
	<i>Podosphaera xanthii</i>	Oïdium	Concombre <i>Cucumis sativus</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Ø	nd	Larsen <i>et al.</i> , 2004
	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Anthraxnose	Concombre <i>Cucumis sativus</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	Accumulation de callose au site de pénétration du pathogène	Lee <i>et al.</i> , 2005
	<i>Alternaria solani</i>	Alternariose	Tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	nd	Fritz, 2006
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Pyriculariose	Riz <i>Oryza sativa</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	Priming Surexpression des gènes <i>OsNPR1</i> , <i>OsNPR5</i> , <i>OsNPR10</i> , <i>OsJAmyb</i> et <i>OsMPKs</i> , <i>OsPBZ1</i> , <i>OsAOC</i>	Campos-soriano <i>et al.</i> , 2012
	<i>Botrytis cinerea</i>	Pourriture grise	Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	Augmentation de cs tenurs de l'ABA reliée à la protection	Fiorilli <i>et al.</i> , 2011
<i>Phytophthora sojae</i>	Pourriture phytophthoénne	Soja <i>Glycine max</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>	+	Libération d'H ₂ O ₂ et accumulation d'AJ L'échange de l'azote par le CMA et du carbone à partir de l'hôte a été accéléré, pendant l'infection, conduisant à une amélioration l'état physiologique de la plante en augementat la biomasse végétale.	Li <i>et al.</i> , 2013	
Chromiste	<i>Phytophthora capsici</i>	Pourritures du poivron	Poivron <i>Capsicum annuum</i>	<i>Glomus fasciculatum</i>	+	Accumulation rapided'H ₂ O ₂ et augmentation des activités POX et SOD	Alejo-Iturvide <i>et al.</i> , 2008
	<i>Phytophthora infestans</i>	Mildiou	Pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i>	<i>Glomus</i> sp.	+	Priming Accumulation des teneurs en AS et sur-expression des gènes PR	Gallou <i>et al.</i> , 2011

Suite tableau 1							
Bactérie	<i>Phytoplasma</i>		<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	nd	<i>Lingua et al., 2002</i>
	<i>Xanthomonas campestris</i>	Pourriture noire	Luzerne <i>Medicago truncatula</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i> <i>Gigaspora gigantea</i> <i>G. versiforme</i>	+	Surexpression des gènes (defense, stress) et notamment, un gène codant pour une « Putative Defensin AMP1 protein » (TC101060) et « Cysteine-rich anti-fungal protein 2 » (TC98064)	<i>Liu et al., 2007</i>
Virus	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Mosaïque du tabac	Tabac <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthinc	<i>Rhizophagus irregularis</i>	-	nd	<i>Shaul et al., 1999</i>
	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> (TYLCSV)	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>	Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker	<i>Funneliformis mosseae</i>	+	nd	<i>Maffei et al., 2014</i>

III. Les stratégies de défense des plantes

I. Résistance des plantes

I. 1. Résistance locale

Dans le cadre d'une interaction hôte-pathogène, si l'agent pathogène colonise la plante et cause une maladie, l'interaction est dite compatible. A l'inverse, lorsqu'il ne se développe pas et ne cause pas de symptômes visibles, l'interaction est dite incompatible.

I. 1. 1. Déterminisme d'une relation hôte compatible

Lors des phases précoces de contact entre la plante et l'agent pathogène fongique, le développement du champignon et sa capacité à infecter la plante vont dépendre considérablement des conditions environnementales, telles que l'humidité extérieure, la température et la lumière. Il existe ensuite plusieurs étapes conditionnant la réussite de l'infection: l'attachement des spores fongiques, la germination de ces spores et la pénétration des tissus végétaux par le parasite (Boulenouar *et al.*, 2011). Pour coloniser la plante, le champignon déploie des armes biochimiques très variées parmi lesquelles des enzymes dégradant des parois comme des chitinases, des toxines et des hormones. Cet arsenal est impliqué dans la pouvoir pathogène, qui varie en fonction du couple parasite/plante (Boulenouar *et al.*, 2011).

Après la pénétration de l'agent phytopathogène à travers la paroi végétale ou via une blessure, sa présence peut être perçue par la plante grâce à des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, pour Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Chisholm *et al.*, 2006). La perception de ces motifs par la plante va entraîner une réponse immunitaire de base (PAMP-Triggered Immunity, PTI), qui peut bloquer l'invasion (Jung *et al.*, 2009). Afin de contrecarrer la PTI ou d'échapper à celle-ci, le bioagresseur peut produire et libérer des effecteurs lui permettant de poursuivre sa colonisation, rendant la plante sensible. On parle alors de sensibilité déclenchée par des effecteurs ou « Effector-Triggered Susceptibility » (ETS) (Li *et al.*, 2013). L'identification de ces effecteurs, parmi lesquels figurent des facteurs de virulence, et la compréhension de leur mode d'action dans la suppression de la PTI, sont des sources de connaissances importantes pour le développement de nouvelles approches de la protection des plantes contre les maladies puisque l'insensibilité à ces effecteurs constitue désormais un critère potentiel d'amélioration variétale.

La réponse de la plante à ce phénomène par une deuxième vague de défense est notamment décrite comme l'immunité déclenchée par les effecteurs (Effector-Triggered Immunity, ETI) (Figure 13). L'immunité de type ETI peut être considérée comme une version amplifiée de l'immunité PTI (García-Brugger *et al.*, 2006). Elle conduit à la mise en place d'une interaction de type « incompatible » qui entraîne une résistance à la maladie et, en

général, une réponse de mort cellulaire hypersensible (HR: Hypersensitive Response) au niveau du site d'infection (Jones et Dangl, 2006).

Les immunités induites (PTI ou ETI) activent une grande variété de défenses passives, limitant l'entrée ou la progression du pathogène dans la plante, mais également des défenses actives qui empêchent le développement du pathogène en le confinant au site de l'infection ou provoquant sa mort.

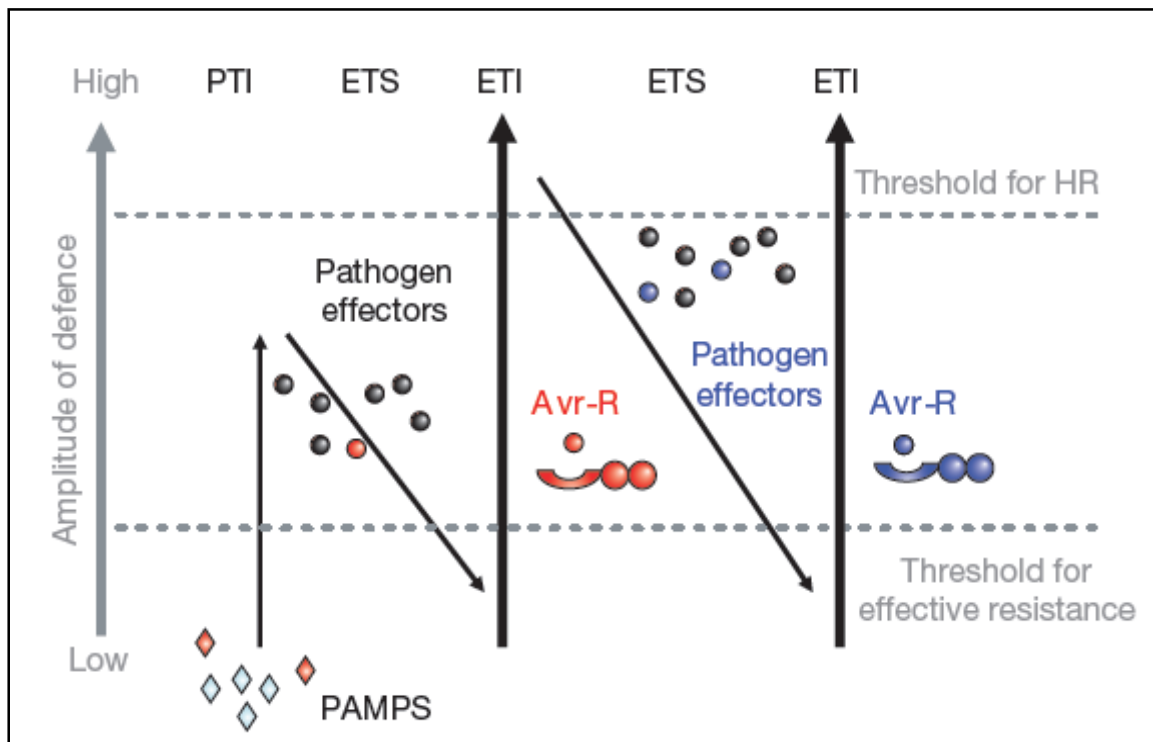


Figure 13: Modèle en Zig-Zag illustrant les mécanismes de défense mis en place contre les agents pathogènes (d'après Jones et Dangl, 2006). ETI: Effector-Triggered-Immunity; ETS: Effector-Triggered-Sensibility; PTI: PAMP-Triggered-Immunity; PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern; Avr-R: avirulence – resistant gene

I. 1. 2. La résistance locale acquise ou Localized Acquired Resistance (LAR)

La LAR est caractérisée par une augmentation de la résistance des tissus adjacents au site d'infection. La LAR est induite dans des tissus sains par les cellules en état de mort cellulaire via la transmission des molécules signales comme l'AS, l'AJ et l'éthylène (ET) se met en place en marge de la zone de la HR (Jones et Dangl, 2006). Une HR se traduisant par une mort cellulaire programmée intervient dans le cas d'une interaction plante/agent pathogène incompatible (Watanabe et Lam, 2006). Lors de la HR, la cellule libérerait des signaux rendant les cellules adjacentes plus réactives et activerait des réponses plus intenses et plus rapides (Kombrink *et al.*, 2001). La HR est souvent associée à des niveaux élevés de protéines PR pour pathogenesis-related protein (« PR » protein), au renforcement des parois

cellulaires et à la production de composés antimicrobiens, les phytoalexines (Hammond-Kosack et Jones, 1996; Ryals *et al.*, 1996; Cordelier *et al.*, 2003). Cet état de résistance est particulièrement efficace pour contrer l'invasion de certains agents pathogènes, notamment les champignons biotrophes. En revanche en cas d'infection par des parasites nécrotrophes, la HR ne serait pas efficace pour restreindre leur colonisation (Cordelier *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005).

I. 2. Résistances systémiques

Suite à la LAR, se met en place une résistance au niveau systémique: la SAR pour « Systemic Acquired Resistance » qui désigne une résistance généralisée à la plante entière, induite à la suite d'une infection localisée par un agent pathogène.

I. 2. 1. La résistance systémique acquise (SAR)

La SAR peut protéger les différents organes des plantes telles que la tige, les feuilles et les fleurs ou les fruits contre une attaque ultérieure par un agent phytopathogène. Son activité protectrice peut durer plusieurs semaines après le premier contact entre la plante et l'agent pathogène (van Loon *et al.*, 2006). L'établissement de la SAR fait intervenir la voie de signalisation dépendante de l'AS (Plett *et al.*, 2011), celui-ci s'accumulant au point d'infection mais également dans les tissus non infectés, à faible concentration (Durrant et Dong, 2004). De plus, la mise en place de la SAR est associée à une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines de défense, telles que les protéines PR. La SAR se trouve aussi dans les tissus éloignés du site d'infection (Gaffney *et al.*, 1993), et est contrôlée par le gène *NPR1*, qui lors de l'activation par l'AS agit comme un co-activateur transcriptionnel d'un grand nombre de gènes codant pour les protéines PR (Dong, 2004; Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2012; Spoel *et al.*, 2012; Vlot *et al.*, 2009). Dans les cellules non induites, NPR1 est séquestré dans le cytoplasme comme un oligomère, puis des changements induits par l'AS facilitent la monomérisation de NPR1, qui va ensuite migrer vers le noyau. NPR1 va ultérieurement pouvoir activer des facteurs de transcription (TGA ou WRKY) qui iront se lier au promoteur des gènes cibles (Pieterse *et al.*, 2014). L'ajout exogène de BTH (acibenzolar-S-methyl-benzothiadiazole), un composé de synthèse mimant la mise en place de la SAR, protège le blé contre l'oïdium via l'induction des gènes codant pour la lipoxigénase et une protéine riche en soufre (Görlach *et al.*, 1996). De même, l'induction de la SAR chez le blé par l'ajout de syringoline extraite de la bactérie

Pseudomonas syringae pv *syringae*, protège la plante contre l'oïdium par induction d'une mort cellulaire (Wäspi *et al.*, 2001) (Figure 14).

I. 2. 2. La résistance systémique induite (ISR)

L'ISR (Induced systemic resistance) est définie comme une résistance induite à distance par des microorganismes bénéfiques de type bactérien (PGPR pour Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) ou Fongique (PGPF) (van Loon *et al.*, 2006; Shores *et al.*, 2010), susceptibles de protéger la plante contre différents agents pathogènes. Les PGPR incluent des bactéries Gram⁺ comme *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus* ou des bactéries Gram⁻, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia* sp. Pour les PGPF, les plus connus sont *F. oxysporum*, *Trichoderma*, et *Piriformospora indica*, (Pieterse *et al.*, 2014). Cette ISR a été observée chez de nombreuses plantes malgré une séparation spatiale entre l'agent bénéfique localisé au niveau racinaire et le site d'infection de l'agent pathogène, localisé au niveau foliaire (Hoffland *et al.*, 1995).

L'ISR fait également appel à l'expression des mécanismes de défense de plantes. Ces mécanismes seraient induits par les PGPR ou les PGPF eux-mêmes ou par des molécules dérivées de ces organismes. L'utilisation de divers mutants d'*Arabidopsis thaliana* a permis de montrer que certaines souches de *P. fluorescens* sont capables de réduire les symptômes des maladies, via des mécanismes dépendant des voies de l'AJ et de l'ET et généralement, indépendant de la voie de l'AS (Van Loon *et al.*, 1998; Knoester *et al.*, 1999; Van der Ent *et al.*, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2014). Néanmoins d'autres travaux montrent que l'ISR pourrait être dépendante de la voie de l'AS (De Meyer et Höfte, 1997; De Meyer *et al.*, 1999), indépendante de ces 3 molécules signales (Ryu *et al.*, 2003) ou encore indépendante des voies de l'AS, de l'AJ, tout en restant dépendante de l'ET (Ryu *et al.*, 2004). Cette résistance s'avère de plus dépendante du génotype végétal, de l'agent pathogène, mais aussi du microorganisme inducteur (Leeman *et al.*, 1995; Van wees *et al.*, 1997).

De plus, l'ISR semble pouvoir induire une potentialisation systémique des défenses de la plante, caractérisées lors d'une infection ultérieure, par une augmentation de l'expression de gènes de défense mais aussi des renforcements des parois au niveau des feuilles (Verhagen *et al.*, 2004) (Figure 14).

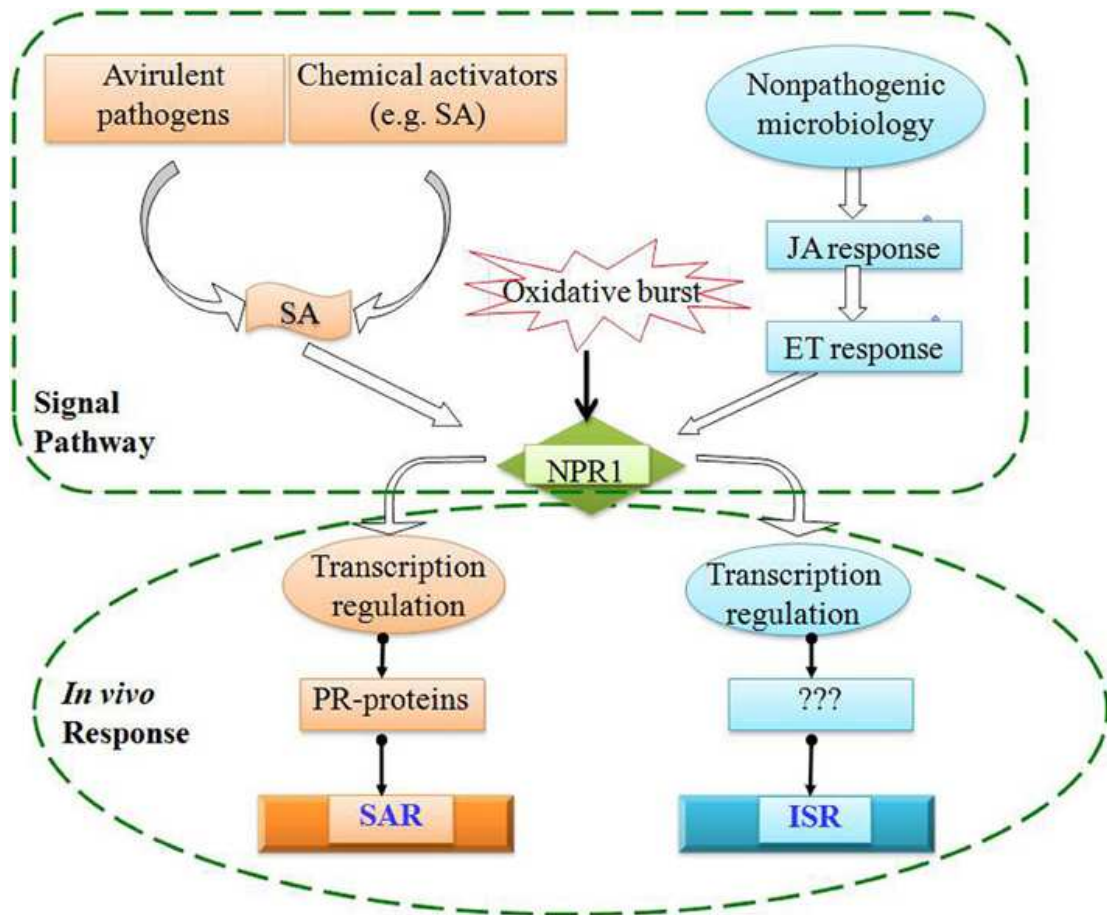


Figure 14: Schéma des mécanismes impliqués dans la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR) Chan, (2013)

I. 2. 3. La résistance induite par les champignons mycorhiziens arbusculaires CMA: la MIR pour Mycorrhizal Induced Resistance

La symbiose mycorhizienne arbusculaire implique des changements importants dans la physiologie de la plante. Par conséquent, cette association peut avoir un impact sur les interactions plantes-microorganismes. De nombreuses études ont montré l'effet protecteur de la colonisation par le CMA contre des bioagresseurs chez différentes plantes (revue dans Whipps, 2004; Jung *et al.*, 2012). La protection observée est liée à la mise en place d'une résistance induite par la mycorhize, appelée MIR (Pozo et Azcón-Aguilar 2007).

Les CMA sont capables de réduire les dommages causés par de nombreux agents pathogènes du sol sur diverses plantes. Bien qu'il existe quelques exemples de protection contre les bactéries pathogènes, la plupart des études se concentrent sur les champignons oomycètes, en particulier, les genres *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Phytophthora* et *Pythium* (Whipps, 2004; Jung *et al.*, 2012). Cette MIR permet également de réduire l'incidence des maladies causées par des nématodes (Pinochet *et al.*, 1996; De La Peña *et al.*,

2006; Li *et al.*, 2006; Elsen *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2012). Les expérimentations des systèmes des racines séparées en deux compartiments (système *split-root*) ont confirmé que la protection des plantes par les mycorhizes pouvait aussi se manifester dans les parties non-colonisées du système racinaire, donc spatialement séparée du site de contact entre la plante et le champignon mycorhizien. L'induction de cette résistance systémique chez la plante est liée à la stimulation de réactions de défense de la plante, telles que l'accumulation des produits phénoliques, des épaisissements de paroi cellulaire ou l'accumulation de protéines de défense PR1a (Cordier *et al.*, 1998; Pozo *et al.*, 2002; Zhu et Yao, 2004; Khaosaad *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2012).

Concernant les maladies foliaires, plusieurs études ont révélé que cette relation entre les agents pathogènes avec des modes de vie différents et des CMA sont complexes. Dans le cas des études menées sur des agents pathogènes hémibiotrophes tels que *Colletotrichum orbiculare* chez le concombre colonisé par *Rhizophagus irregularis* (Lee *et al.*, 2005) ou *Funneliformis mosseae* (Chandanie *et al.*, 2006), et *Phytophthora infestans* chez la pomme de terre colonisée par *Glomus* sp (Gallou *et al.*, 2011), l'impact des CMA varie d'aucun effet à des réductions d'infections significatives. En ce qui concerne l'infection par des agents pathogènes nécrotrophes tels que *Botrytis cinerea* ou *Alternaria solani*, il a été montré une réduction de l'infection par ces parasites dans des plants de tomates mycorhizés par *F. mosseae* ou *R. irregularis* (Jung *et al.*, 2009; Fiorilli *et al.*, 2011; Fritz *et al.*, 2006). A l'inverse, les travaux menés sur des agents biotrophes montrent une absence d'efficacité des mycorhizes pour protéger la plante, voire une augmentation de l'expression des symptômes de la maladie. Dugassa *et al.* (1996) ont ainsi rapporté que l'infection par *Oidium lini* a été augmentée sur la partie foliaire des plantes du lin colonisé par *R. irregularis*. De même, Gernns (2001) a décrit que l'orge mycorhizée avec *Glomus etunicatum* était plus sensible à *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, alors que Larsen *et al.* (2004) n'ont pas observé de protection contre *Podosphaera xanthii* chez le concombre colonisé par le CMA *R. irregularis*. Un effet protecteur a été observé sur les feuilles de concombre colonisés par *R. irregularis* et infecté par *C. orbiculare*; cette résistance serait liée à un dépôt de callose au site de pénétration (Lee *et al.*, 2005). Lors de l'interaction de *Medicago truncatula* avec le champignon mycorrhizien *R. irregularis*, l'expression de nombreux gènes impliqués dans les défenses des plantes a été induite dans les tissus foliaires en comparaison avec des plantes non-mycorhizées, suggérant une réponse systémique induite à partir de racines de la plante (Liu *et al.*, 2007). En outre, une induction systémique de gènes de régulation liés à la défense a été observée dans les feuilles

de riz mycorhizées parallèlement à un gain de protection contre l'agent pathogène hémibiotrophe *Magnaporthe oryzae* (Campos-Soriano *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la colonisation de la tomate par le CMA *Glomus fasciculatum* induit une protection contre l'agent pathogène foliaire *Alternaria alternata* (Nair *et al.*, 2015). Cette protection a été associée à une accumulation de l'AJ et à une stimulation de l'activité enzymatique de la LOX. Des racines mycorhizées de *Medicago trunculata* ont été utilisées pour étudier l'activité LOX. Ces travaux ont montré qu'une activité 13-LOX apparaît supérieure à celle d'une activité 9-LOX. Seuls les produits dérivés de l'activité 13-LOX conduisent à la formation des molécules signales comme l'AJ et ses dérivés (Stumpe *et al.*, 2005). La MIR sensibilise les tissus végétaux localement et de façon systémique à stimuler plus rapidement et plus fortement les mécanismes de défense lors d'une infection ultérieure avec un agent pathogène. En absence d'infection, aucune induction de réactions de défense n'est observée chez la plante mycorhizée. Cet effet est qualifié de potentialisation, ou *priming* (Pieterse *et al.*, 2009). Néanmoins, dans certaines études, l'effet de la mycorhization seule est capable d'induire des réactions de défense en conditions non-infectieuses, réponses qui seront ensuite largement stimulées au moment de l'infection par le pathogène, on parlera alors d'élicitation par le champignon mycorhizien (Liu *et al.*, 2007; Campos-Soriano *et al.*, 2012). La mise en place de cette MIR semble être indépendante de l'AS et se distingue donc d'une SAR-like, mais serait plutôt médiée par l'AJ (Cameron *et al.*, 2014). Il a été montré par Jung *et al.* (2009) que la MIR induite par *F. mosseae* contre *B. cinerea* pourrait être associée à un *priming* régulée par des voies dépendantes de l'AJ, régulation décrite pour fonctionner avec le même mécanisme que l'ISR (Pozo et Azcon-Aguilar, 2007).

Néanmoins pour certains auteurs, la mise en place de l'état de résistance systémique appelée « MIR » pourrait être lié à un double effet, additionnant l'effet direct de la symbiose mycorhizienne à celui « indirect » de la colonisation du sol par des populations bactérienne non-pathogènes. En effet, Cameron *et al.* (2013) suggèreraient qu'une fois la symbiose mycorhizienne installée au niveau des racines de la plante, celle-ci stimulerait fortement le développement de la microflore du sol au niveau de la zone appelée « mycorhizosphère ». L'installation de populations bactérienne bénéfiques pourrait ensuite agir sur la plante en induisant une ISR, préparant la plante à résister plus efficacement à une future infection par un pathogène). Akhtar et Siddiqui, (2008) ont montrés chez le pois chiche (*Cicer arietinum*) inoculé par la combinaison d'un CMA, d'une bactérie nodulante et de *Pseudomonas straita*, une protection significative de la plante contre le champignon hémibiotrophe *Macrophomina*

phaseolina. Cette protection est plus importante chez les plantes inoculées avec le mélange des 3 organismes bénéfiques que chez les plantes inoculées avec les traitements individuels.

II. Les mécanismes de défense des plantes

II. 1. Les mécanismes de défenses constitutives

Les plantes répondent aux agressions des agents pathogènes par des défenses variées. Certaines d'entre elles sont constitutives (ou passives) et d'autres sont induites, telles que l'accumulation de composés phénoliques ou de protéines PR. Les défenses passives se caractérisent par des barrières physiques (cuticule, paroi cellulaire, cires épicuticulaires ...) (Kauffmann *et al.*, 2001) et des défenses chimiques (exsudats antimicrobiens...) (Hammond-Kosack et Jones, 1996; Wittstock et Gershenzon, 2002).

➤ **Les barrières physiques**

Lors d'une interaction plante/champignon pathogène, le champignon doit franchir la 1^{ère} barrière, représentée par la cuticule. L'adhésion des spores fongiques sur la cuticule et la libération d'enzymes capables de dégrader les constituants de la cuticule vont conditionner sa capacité à pénétrer la plante. La paroi végétale constitue une seconde barrière, elle est composée de polymères polysaccharidiques, comme la cellulose, la pectine et l'hémicellulose. Ces polymères sont associés à des composés phénoliques qui vont former des complexes structuraux importants pour la résistance des tissus végétaux.

La cuticule et l'épaisseur de la paroi cellulaire vont influencer sur la capacité de la plante à résister à la pénétration des agents pathogènes fongiques. Au cours du développement du blé, on distingue des sensibilités différentes à la pénétration par *Puccinia graminis*, agent de la maladie de la rouille noire des tissus foliaires. Ce champignon n'affecte que les plantules de blé jeunes possédant une cuticule fine, le tube germinatif produit par le champignon n'étant pas capable de traverser la cuticule épaisse des feuilles âgées (Guest et Brown, 2001).

De plus, la cuticule, du fait de sa teneur en cires épicuticulaires importante, va limiter la formation d'un film d'eau sur la surface de la feuille. L'absence d'humidité sur ces tissus va inhiber la germination de certains champignons (Guest et Brown, 2001).

II. 2 Mécanismes de défense induits

Dans le cadre d'une ISR ou une SAR, les défenses se manifestent au site d'infection par le parasite. Les mécanismes décrits ci-après peuvent être retrouvés dans le cas des PTI, ETI, ISR, SAR ou MIR.

L'immunité de la plante implique également des défenses typiques déclenchées par un éliciteur. Le terme « éliciteur » a pour origine étymologique le verbe anglais *to elicit* (provoquer) et est associé à l'induction des défenses naturelles induites (ou actives) par un microorganisme.

Les défenses induites qui se mettent en place lors de l'interaction entre la plante et un agent pathogène (Jones et Dangl, 2006) sont les conséquences des trois étapes majeures:

- 1- reconnaissance/ perception de la présence du pathogène
- 2- transduction du signal de la reconnaissance
- 3- expression des gènes de défense

La résistance de la plante est généralement dépendante de nombreux facteurs, impliquant sa réceptivité et la précocité de la mise en route des réactions de défense, vis-à-vis de l'agent pathogène. Les réactions sont diverses et impliquent différentes cascades de transduction du signal, de signalisation intercellulaire, aboutissant à l'expression typique de défense.

II. 2. 1. La reconnaissance des agents pathogènes par les plantes

La reconnaissance des agents pathogènes par les plantes peut provenir des molécules sécrétées par le bioagresseur (PAMP). Ces motifs sont de nature peptidique, lipidique ou polysaccharidique. On distingue également les « Damage-Associated Molecular Patterns » (DAMP), qui sont des molécules protéiques ou glucidiques issues de la dégradation des parois végétales par les enzymes de l'agent pathogène et sont des éliciteurs endogènes. PAMP et DAMP sont reconnus par des récepteurs transmembranaires, les Pathogenesis-Related Receptors (PRR), comme les marqueurs d'une attaque. Cette reconnaissance induit des réactions immunitaires innées dans le cadre de l'immunité déclenchée par les PAMP ou PTI (Mengiste, 2012; Nürnberger et Scheel, 2001).

II. 2. 2. Transduction du signal intracellulaire

Après la phase de reconnaissance de l'agent pathogène, des réactions rapides de transduction du signal se mettent en place dans les cellules de la plante agressée. Les flux ioniques, les FAO, les MAPKs, l'induction de phospholipases et la synthèse de différentes hormones végétales comme l'AS, l'AJ et l'ET par exemple. Ces réponses interviennent tout d'abord au niveau intracellulaire puis ensuite au niveau intercellulaire (García- Brugger *et al.*, 2006; Kachroo et Kachroo, 2007).

II. 2. 2. 1. Par des flux ioniques

En réponse à la perception d'un éliciteur, on observe un influx d'ions calcium Ca^{2+} (entrée d'ions dans la cellule) et de protons H^+ ainsi qu'un efflux d'ions potassium K^+ et d'ions chlorure Cl^- (sorties d'ions de la cellule vers le milieu extracellulaire). Les flux d'ions à travers la membrane plasmique (influx de Ca^{2+} et H^+ et efflux de K^+ et Cl^-) et la dépolarisation membranaire qui en découle ont lieu dès les premières minutes de l'interaction. C'est la réponse la plus précoce à la reconnaissance spécifique d'un agent pathogène. De plus, les ions Ca^{2+} , en particulier, ont un rôle essentiel dans la cascade de signalisation puisqu'ils permettent en partie l'activation des gènes de défense de la plante. En plus, il est important pour le bon fonctionnement des protéines kinases qui interviennent dans la phosphorylation/déphosphorylation de diverses protéines (Lecourieux *et al.*, 2006). L'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol est nécessaire pour l'activation du stress oxydant et de la mort cellulaire chez *A. thaliana* en réponse à *P. syringae* (Grant *et al.*, 2000; Bent, 2001; Lecourieux *et al.*, 2006). (Figure 15).

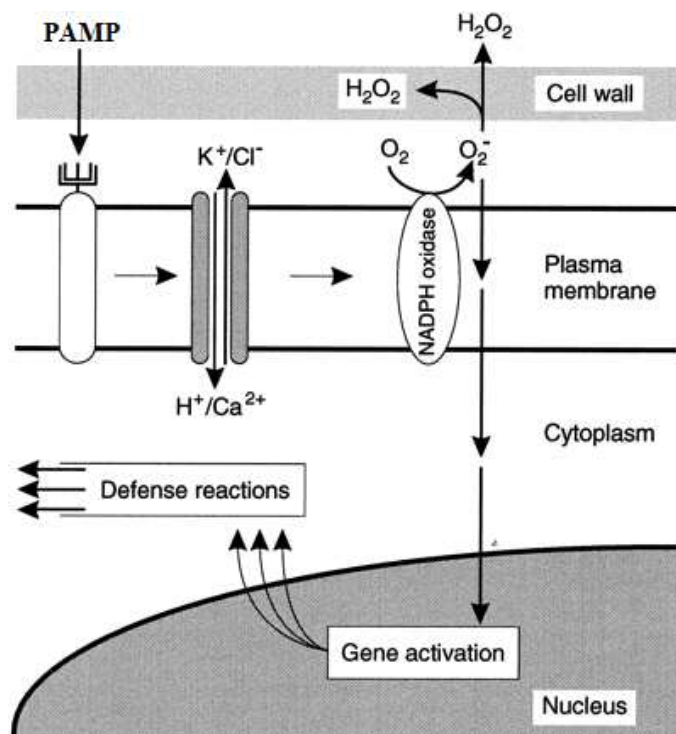


Figure 15: Schéma représentant les flux ioniques dans la cellule végétale en réponse à l'infection (Jabs *et al.*, 1997)

II. 2. 2. 2. Production de Formes Actives de l'Oxygène (FAO)

Les FAO sont essentiellement représentées par l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroperoxyde (HO_2^\cdot), le radical hydroxyle (OH^\cdot) et enfin le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Ce dernier est la forme la plus stable et est impliqué dans les défenses de la plante. Ces molécules intermédiaires sont toxiques; elles résultent d'étapes successives de la réduction de l'O₂ moléculaire (Kotchoni, 2004).

Chez les plantes, il existe plusieurs sources de production de FAO, incluant la NADPH oxydase, les peroxydases apoplastiques, et les autres oxydases localisées dans les mitochondries, les chloroplastes et les peroxysomes (Davletova *et al.*, 2005). La NADPH oxydase est un complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydo-réductases. Une réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O₂) va être déclenchée, ce qui produit du NADP⁺, du H⁺ et de l'O₂⁻. Ces deux derniers réagiront pour former de l' H₂O₂. Ce complexe enzymatique NADPH permet donc la synthèse de FAO. Lors de l'interaction entre la plante et son environnement biotique, ces composés oxygénés vont s'accumuler et participer au « burst oxydatif » (Mittler *et al.*, 2004; Scandalios 2005) à l'origine d'autres réactions de défense de la plante plus tardives. Ainsi, l'H₂O₂ est notamment impliqué dans le renforcement des parois cellulaires (Mellersh *et al.*, 2002), la mise en place de la HR, l'induction de l'expression de gènes de défense (Grant et Loake, 2000) et est également susceptible d'inhiber directement la germination des spores de nombreux agents pathogènes (Low et Merida, 1996; Lamb et Dixon, 1997).

Mellersh *et al.* (2002) ont démontré que la production rapide et localisée d'H₂O₂ est l'une des premières réactions de défense détectables au niveau cytotologique face à la pénétration de la cellule végétale par différents agents pathogènes fongiques. Néanmoins, lors de l'interaction du blé avec *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, une différence dans la cinétique de production H₂O₂ est relevée entre des variétés de blé résistantes ou sensibles (Qi *et al.*, 2008). La synthèse d'H₂O₂ est bi-phasique (avec un premier pic important) lors d'une interaction de type « incompatible » et monophasique lors d'une interaction de type « compatible ».

II. 2. 2. 3. Modifications de la phosphorylation des protéines

Les MAP-kinases (pour mitogen-activated protein kinase) sont des kinases qui catalysent la phosphorylation des protéines. Les voies de signalisation MAP kinases impliquent une série de kinases qui s'activent en cascade: la MAP kinase est activée par une MAP kinase-kinase, elle-même activée par une MAP kinase-kinase-kinase. Des cascades de signalisation faisant intervenir des MAPKs sont connues pour être activées rapidement lors des interactions plante-agent pathogène (Zhang et Klessig, 2001). En effet, la plupart des

PAMPs connus peuvent activer les MAPKs; la flagelline (peptide flg22) constitué de 22 acides aminés conservé chez de nombreuses espèces bactériennes est suffisante pour déclencher un ensemble de réactions de défense (Boller et Felix, 2009), comme l'activation rapide et forte des MPK3, MPK4 et MPK6 chez *A. thaliana* (Droillard *et al.*, 2004). La phosphorylation d'une protéine peut altérer son activité biologique intrinsèque, sa localisation subcellulaire et son temps de demi-vie (Xing *et al.*, 2002). Les MAPKs phosphorylent une variété de substrats incluant des facteurs de transcription, des protéines kinases et des protéines associées au cytosquelette (Nakagami *et al.*, 2005). Les facteurs de transcription activés viendront agir ensuite sur leur cible dans le noyau (Cargnello et Roux, 2011). Les MAPKs activées régulent l'expression des gènes codant pour des PR-protéines et ceux qui participent à la mise en place d'une HR-like et d'une SAR (Gao *et al.*, 2011).

Takezawa, (1999) décrit l'induction de l'expression du gène *WCK-1* codant pour une MAPK chez le blé par un éliciteur fongique extrait de *Typhula ishikariensis*. Dans le cadre d'interactions incompatibles blé-*Fusarium graminearum* ou blé-*Puccinia triticina* (souche BBB), l'expression du gène *TaFLRS* codant pour une MAPK est observé quelques heures après l'infection, alors qu'aucune accumulation de ce transcrit n'est observée lors d'une interaction compatible (Gao *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que cette MAPK est impliquée dans l'induction de réactions de défense efficaces pour lutter contre ces agents pathogènes, qu'il s'agisse d'un biotrophe (*Puccinia triticina*) ou d'un nécrotrophe (*Fusarium graminearum*).

II. 2. 2. 4. Phospholipases

L'activation de phospholipases (A type 2, C et D) est observée chez des plantes soumises à différents stress biotiques ou à l'application d'éliciteurs (Chandra *et al.*, 1996; Van der Luit *et al.*, 2000). Les phospholipases hydrolysent les phospholipides membranaires et permettent la libération de signaux (lysophospholipide, acide phosphatidique, inositol 1,4,5 triphosphate) (Sang *et al.*, 2001) et de substrats d'enzymes de la voie des lipoxgénases (LOX) (Blée, 1998). Cette voie de la LOX ou voie des octadécanoïdes a été principalement étudiée pour son implication dans la production d'importantes molécules signal (AJ, méthyl jasmonate: MeAJ) (Blée, 2002). Les phospholipides membranaires interviennent comme de simples barrières physiques (Shah, 2005), mais ils peuvent donc aussi agir comme des messagers participant au signal de transduction mis en place en réponse au stress (Weber, 2002). L'acide phosphatidique pourrait être généré par 2 voies différentes. La première

implique la phospholipase D (EC 3.1.4.4), agissant sur l'hydrolyse des phospholipides membranaires, en particulier la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE). La deuxième voie de formation de l'acide phosphatidique met en jeu deux enzymes agissant de façon séquentielle: la phospholipase C (PLC) (EC 3.1.4.3) hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns (4,5) P₂ ou PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (Ins (1,4,5) P₃) et diacylglycérol (DAG). Le DAG reste dans la membrane et est rapidement phosphorylé en acide phosphatidique par la diacylglycérol kinase (DGK) (Wang *et al.*, 2006).

II. 2. 3. Signalisation intercellulaire

Suite à ces événements précoces, une signalisation intercellulaire prend le relais et permet une transmission du signal de l'agression (Kachroo et Kachroo, 2007). Cette communication intercellulaire se met en place via des phytohormones susceptibles de se déplacer dans toute la plante. Ces molécules interviennent lors de la mise en place des réactions de défense. Les molécules principalement impliquées dans cette signalisation sont l'AJ, l'AS, l'ET. A ces 3 molécules sont aussi associées d'autres phytohormones comme l'Acide abscissique (ABA) ou l'auxine.

II. 2. 3. 1. L'acide salicylique

L'acide salicylique (AS) est un composé issu de la voie des phénylpropanoïdes. La biosynthèse de l'AS débute par la conversion de la phénylalanine en acide trans-cinnamique via l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Le passage de l'acide trans-cinnamique à l'AS fait intervenir l'acide benzoïque qui, par une hydroxylation du carbone-2, permet d'obtenir l'AS (Figure 16). La production de l'AS augmente après l'infection de la plante par différents types d'agents pathogènes (Chen *et al.*, 1993,1995; Glazebrook, 2005). L'AS joue un rôle dans l'expression des gènes codant pour des protéines de défense, l'AS intervient également dans le contrôle de la HR en agissant sur des enzymes telles que la catalase (CAT) et la peroxidase (POX) qui modulent la production d'H₂O₂ (Morkunas et Gmerek 2007; Abohatem *et al.*, 2011).

Pál *et al.* (2011) ont mené une étude sur les variations du taux d'AS endogène chez 4 lignées de blé après infection avec *Bgt* dans le but de chercher une corrélation entre les changements observés et le niveau de tolérance à *Bgt*. Les niveaux de base d'AS chez les lignées Lr33 et Lr19, sensible et résistante respectivement, augmentent 7 jours après infection avec *Bgt*. Bien que l'AS joue un rôle important dans la réponse de la plante au cours de stress

biotique, aucune corrélation n'a été établie lors de cette étude entre les changements de niveaux d'AS induits par *Bgt* et le niveau de résistance à l'oïdium des lignées de blé étudiées.

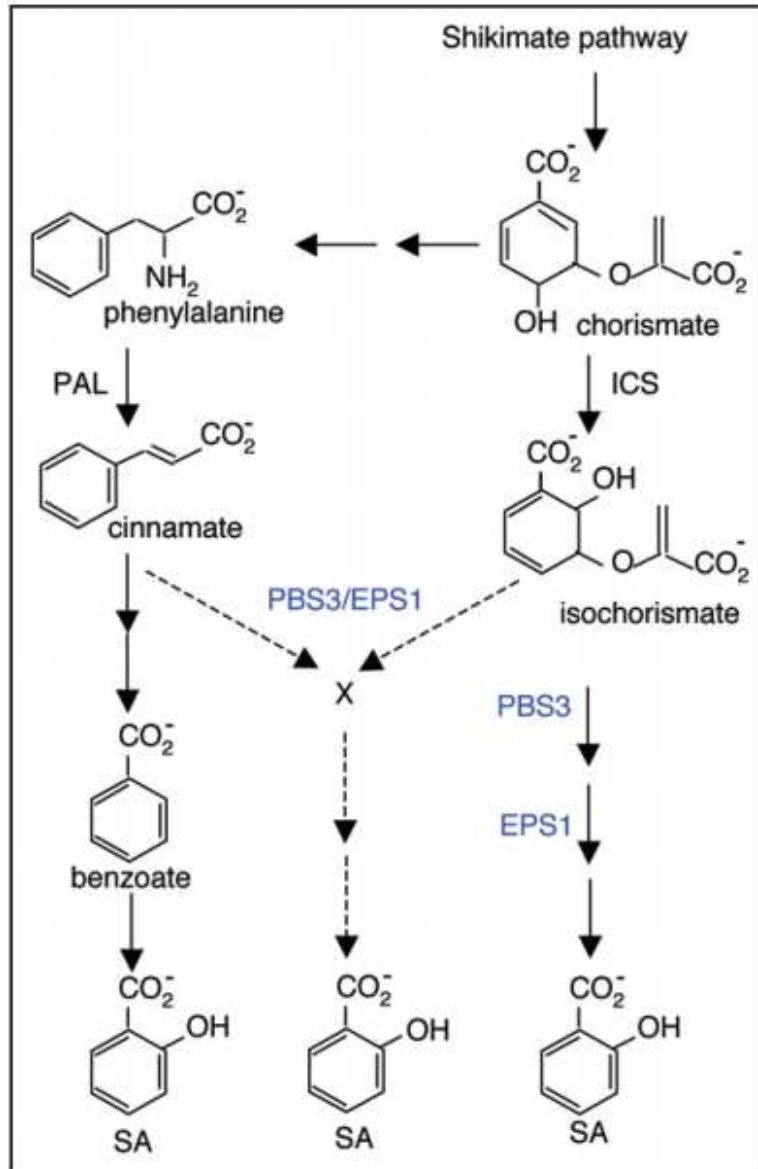


Figure 16: Biosynthèse de l'acide salicylique (Chen *et al.*, 2009)

(ICS isochorismate synthase, SA salicylic acid, PAL phenylalanine ammonia lyase, *PBS3* et *EPS1* sont des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AS et induit lors de l'infection par un agent pathogène)

II. 2. 3. 2. L'acide jasmonique

L'acide jasmonique (AJ), et son dérivé, le méthyl jasmonate (MeJA) sont des composés appartenant au groupe des oxylipines, connues pour être issues de la voie des octadécanoïdes également appelée la voie des lipoxygénases (LOX), enzyme clé de cette voie. La LOX (EC 1.13.11.12) est une enzyme qui catalyse la dioxygénation des acides gras polyinsaturés pourvus d'une configuration en 1-4 pentadiène, les acides gras hydroperoxydés formés

peuvent, par la suite, être convertis en de nombreux produits collectivement appelés les oxylipines (Rosahl, 1996). Deux voies majeures d'implication de la lipoxygénase ont été décrites pour le métabolisme des acides gras hydroperoxydés, la 9 LOX et la 13 LOX (Shibata, 1996) (Figure 17). Chez les plantes supérieures, les acides linoléique (C18:2) et linoléinique (C18:3) apparaissent comme les principaux précurseurs des oxylipines (Larodan 2006). L'AJ et le MeJA sont principalement synthétisés à partir de l'acide linoléinique (C18:3). L'insertion d'un atome d'oxygène en position 13 à l'acide α -linoléinique catalysé par la 13-LOX (Figure 17) conduit à la formation d'hydroperoxydes, qui sont très rapidement convertis par un allène oxyde synthase (AOS) en un allène oxyde, composé instable.

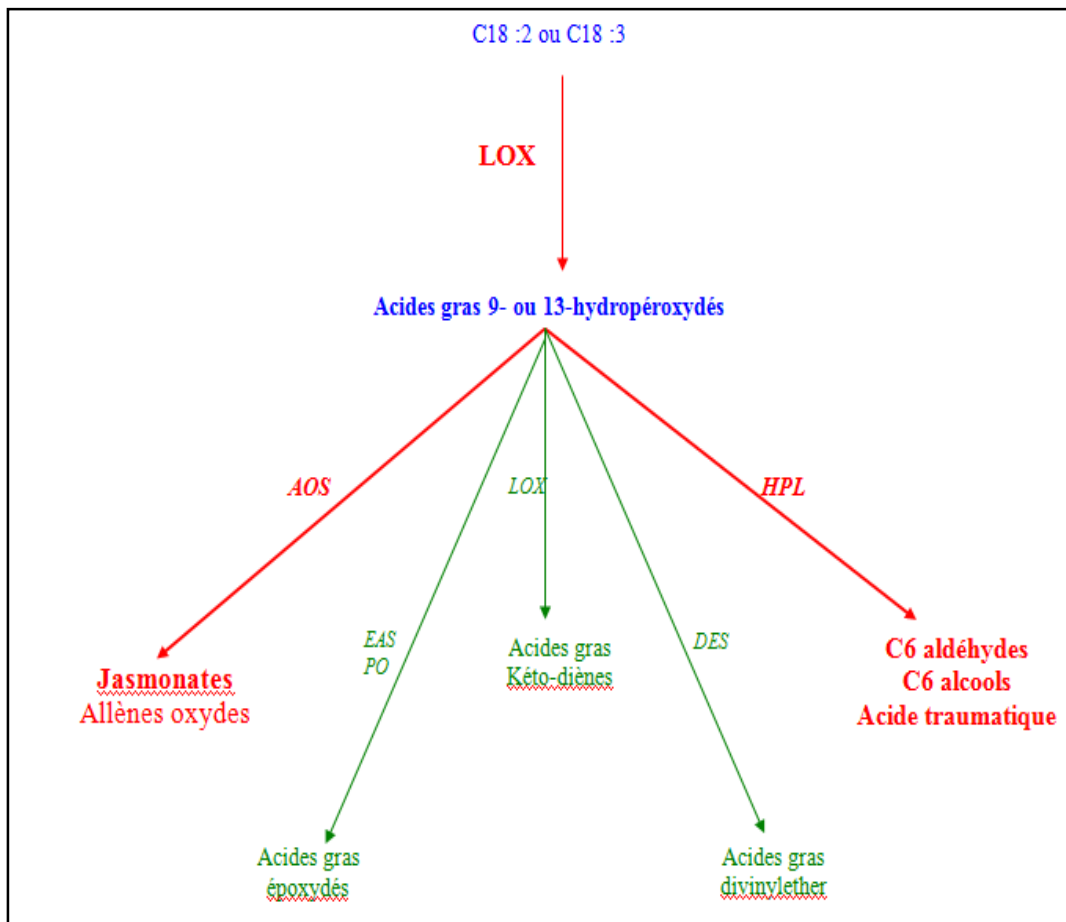


Figure 17: Voie de la lipoxygénase, Feussner *et al.* (2002).

AOS: allène oxyde synthase - EAS: epoxy alcohol synthase - PO: peroxidase
 LOX: lipoxygénase - DES: divinylether synthase - HPL: hydroperoxyde lyase

Ce dernier va rapidement être converti en acide (13S)- oxophytodienoïque (OPDA) via une enzyme, l'allène oxyde cyclase (AOC). Cet énantiomère est le précurseur unique de la forme naturel le (+)-7-iso-AJ qui est formé par réduction de l'OPDA via une OPDA réductase (OPR) et trois étapes de β -oxydation (Hause *et al.*, 2002) (Figure 18).

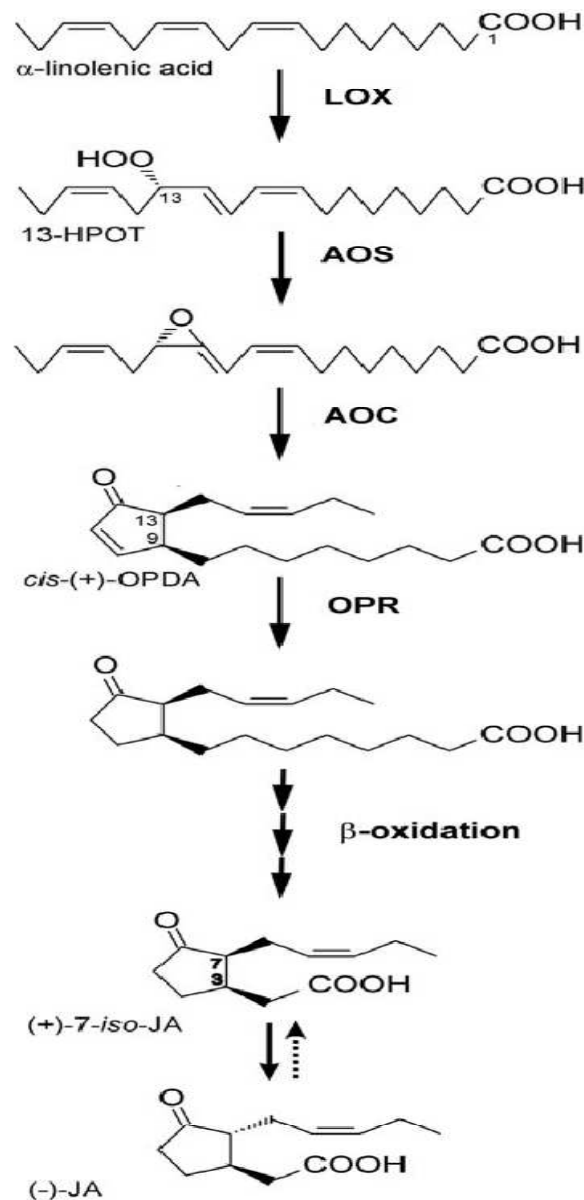


Figure 18: Voie de biosynthèse de l’AJ. Les enzymes de la voie de biosynthèse de l’AJ sont: 13-lipoxygénase (13-LOX), AOS: allène oxide synthase, AOC: allène oxide cyclase, et OPR: oxophytodienoic acid reductase (Hause *et al.*, 2002)

Il fait partie intégrante de la transduction du signal qui permet l’induction des gènes de défense en réponse à des signaux induits par des stress biotiques et abiotiques (Wasternack et Parthier, 1997).

Un traitement exogène de blé par l’AJ a réduit l’infection par *Tilletia indica* chez deux cultivars sensible et résistant en induisant une mort cellulaire programmée et la lignification. L’ajout de l’AJ exogène mime l’éllicitation des réactions de défense de la plante, et a ainsi pu agir sur le métabolisme secondaire (Gündlar *et al.*, 1992; Tamogami et Kodama., 2000). Bien que l’AJ soit considéré comme la molécule principale issue de cette voie des octadécanoïdes,

l'OPDA pourrait également jouer un rôle dans la mise en place des réactions de défense de la plante. En effet, un stress osmotique induit chez l'orge une forte accumulation de l'OPDA au niveau des feuilles (Kramell *et al.*, 2000). L'AJ et L'OPDA apparaissent alors comme des molécules signales, qui régulent précocement les mécanismes de défense, comme l'expression des gènes de défense chez le riz (Rakwal *et al.*, 2002). Une augmentation de l'activité LOX a été corrélée avec la résistance des plantes contre un agent pathogène (Slusarenko, 1996) et a été observée au cours de plusieurs interactions comme celles par exemple entre, le riz et *Magnaporthe grisea*, le tabac et *Erysiphe cichoracearum*, et le haricot et *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola* (Ohta *et al.*, 1991; Lupu *et al.*, 1980; Croft *et al.*, 1990).

Il a été trouvé par Zhu *et al.* (2014) que TaPIE1 (pour *Triticum aestivum* Pathogen-Induced ERF1 ethylene response factor 1) régule positivement les réactions de défense contre *Rhizoctonia cerealis* en activant la sous-expression des gènes de défense codant pour de la biosynthèse de l'éthylène chez le blé.

II. 2. 3. 3. L'éthylène (ET)

L'éthylène est une hormone végétale volatile synthétisée à partir de la méthionine. Il est capable de se déplacer par diffusion à partir de son site de synthèse (van Loon *et al.*, 2006). Il intervient dans la plante lors de la germination des graines, du mûrissement des fruits, du vieillissement des plantes et est également impliqué dans les mécanismes de défense des plantes aux stress abiotiques et biotiques (van Loon *et al.*, 2006). La résistance ou l'infection des plantes dépendent du moment de traitement par l'éthylène lorsque celui-ci est appliqué de façon exogène (Abeles *et al.*, 1992). La voie de l'éthylène est impliquée dans la stimulation des protéines PR (Martinez *et al.*, 2001). Il a été trouvé par Zhu *et al.* (2014) que TaPIE1 (pour *Triticum aestivum* Pathogen-Induced ERF1 ethylene response factor 1) régule positivement les réactions de défense contre *Rhizoctonia cerealis* en activant la sous-expression des gènes de défenses codent pour de la biosynthèse de l'éthylène chez le blé.

L'AS, l'AJ et l'ET sont susceptibles de réguler les réponses de défense par des interactions synergiques ou antagonistes (Glazebrook, 2001; Melotto *et al.*, 2006). L'implication de ces molécules dans la signalisation intercellulaire diffère suivant l'espèce végétale et la nature de l'éliciteur. Chez une monocotylédone, le riz, Lee *et al.* (2004) ont corrélé l'augmentation de la quantité d'AJ endogène avec une diminution de l'AS au niveau de feuilles de riz blessées. Ils ont ainsi émis l'hypothèse de l'existence d'une régulation antagoniste entre ces deux molécules permettant d'inhiber plus ou moins la synthèse de l'AJ en fonction de l'activation de celle de l'AS.

II. 2. 3. 4. Autres phytohormones

L'**acide abscissique** (ABA), appartient à la grande famille des isoprénoïdes. En plus d'agir sur la fermeture des stomates, la physiologie de la graine (Wasilewska *et al.*, 2008) ou l'embryogenèse, l'ABA est également un modulateur complexe de réponses de défense des plantes (Asselbergh *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2012; Sánchez-Vallet *et al.*, 2012). Une faible biosynthèse de l'ABA a été observée chez la tomate et des mutants d'*Arabidopsis* et a été suivie par une augmentation de la résistance à différents types d'agents pathogènes (*Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae*, *Fusarium oxysporum*, *Plectosphaerella cucumerina* et *Hyaloperonospora parasitica*) (Audenaert *et al.*, 2002; Mohr et Cahill, 2003; Torres-Zabala *et al.*, 2007; 2009; Garcia-Andrade *et al.*, 2011; Sánchez-Vallet *et al.*, 2012). L'antagonisme de l'ABA avec les principales hormones impliquées dans la réponse de défense de la plante (SA, JA, et ET) a été décrit lors de traitements hormonaux exogènes (Yasuda *et al.*, 2008; De Torres Zabala *et al.*, 2009; Sánchez-Vallet *et al.*, 2012). L'expression de gènes d'un mutant d'*Arabidopsis* (*aba1-6*) pour l'ABA va être différemment affectée en réponse à l'ajout de molécules signal comme l'AS, l'AJ et l'ET (Sánchez-Vallet *et al.*, 2012). De plus, Adie *et al.* (2007) démontre que l'ABA est nécessaire pour la biosynthèse de l'AJ, qui est indispensable pour la résistance d'*A. thaliana* à *Pythium irregulare* (Adie *et al.*, 2007).

Les auxines sont un groupe de molécules, y compris l'AIA (acide indole-3-acétique) qui régissent de nombreux aspects de développement de la plante, comme la dominance apicale, le gravitropisme racinaire, la formation des poils racinaires, des racines latérales, de l'émergence des feuilles et des fleurs (Kieffer *et al.*, 2010; Swarup et Péret, 2012). L'auxine est également connue pour réguler les mécanismes de résistance contre les agents pathogènes (Kazan et Manners, 2009). Par exemple, le traitement du riz avec de l'AIA cause la sensibilité à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, probablement à la suite de l'activation de la biosynthèse d'une paroi cellulaire liée à l'extension, ce qui facilite le développement de l'agent pathogène (Ding *et al.*, 2008).

III. Les réponses de défenses tardives

III. 1. Renforcement des parois

Lors d'une attaque par un agent pathogène, l'une des réponses les plus courantes est la néo-formation de composés qui viennent renforcer la paroi, tels que des polysaccharides, de la lignine, de la subérine et des protéines riches en hydroxyproline (HRGP) (Benhamou *et al.*, 1996). La formation de dépôts entre la paroi et la membrane caractérise la formation

d'appositions nommées papilles et constitue une barrière à la progression des hyphes mycéliens au sein des espaces inter-cellulaires. Celles-ci peuvent être constituées de callose, de polyphénols, de silice, de calcium et/ou de lignine et de composés antimicrobiens ou même d'enzymes hydrolysantes (Lepoivre *et al.*, 2003). Parmi les réactions de renforcement de la paroi, la lignification et la formation de papilles associée à un dépôt de callose important ont été observées lors de l'infection du blé par différents agents pathogènes.

III. 1. 1. La lignification

L'accumulation de la lignine est une réponse de défense efficace de la plante (Zheng *et al.*, 2005), en provoquant la rigidification de ses parois (Wi *et al.*, 2005). La lignine est un constituant pariétal hydrophobe issu de la voie des phénylpropanoïdes. Pour rappel, la première enzyme de cette voie est la PAL (Phénylalanine Ammonia Lyase) et va réguler la production de monomères nécessaires à la biosynthèse de lignine suite à un stress (Campbell et Ellis, 1992; Eberhardt *et al.*, 1993). A partir de la phénylalanine, l'action de la PAL permet d'obtenir l'acide transcinnamique, puis une série d'hydroxylations et de méthylations de cet acide va conduire à la formation des acides paracoumarique, caféique, férulique, 5-hydroxyférulique et sinapique. Ces acides seront ensuite réduits sous l'action de plusieurs enzymes, entre autre la CAD (pour Cinnamyle Alcohol Dehydrogenase) (EC1.1.1.195) en alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique. La polymérisation de ces monolignols, sous l'action des peroxydases (POX), aboutit à la formation de la lignine (Boudet, 2000, Caulet, 2009). Chez *T. monococcum* infecté par *Bgt*, 10 gènes *TmPRXs* codant pour des POXs ont été mis en évidence, dont le gène *TmPRX-1* qui est induit en réponse à l'attaque d'un agent pathogène. De plus, les POXs et l' H_2O_2 régulent l'accumulation de la pectine dans les cellules lignifiées (Wi *et al.*, 2005). Suite à l'attaque de parasites, les activités comme la PAL et la POX, fortement impliquées dans la formation de la lignine, sont stimulées (Brill *et al.*, 1999 ; Bucciarelli *et al.*, 1998). Chez le blé *T. monococcum*, l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des monolignols, comme *TmPAL* et *TmCAD*, est induite aussi bien au cours d'une interaction compatible qu'incompatible avec *Bgt*. Le *gene silencing*, des gènes de biosynthèse de monolignols augmente la sensibilité des feuilles de blé à *Bgt* et compromet même la résistance du blé à *Blumaria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) (Bhuiyan *et al.*, 2009).

La présence d' H_2O_2 dans les papilles est un marqueur biochimique qui distingue les parois cellulaires des cellules non pénétrées et des cellules pénétrées lors de l'interaction orge/ou blé/oïdium (Troch *et al.*, 2014; Huckelhoven *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005). Thordal-Christensen *et al.*, (1997); Hückelhoven *et al.*, (1999); Zhang, (2001) et Nakagami, (2005) ont

démonstré que lors d'interactions incompatibles, les plantes réagissent contre un agent pathogène en activant les réactions de défense à plusieurs étapes, y compris la production rapide de FAO comme H_2O_2 , le renforcement des parois cellulaires et l'induction de l'hypersensibilité (HR) – comme réponse localisée aux sites d'infection. Récemment, dans le cas de l'oïdium du blé infectant le triticale, qui est l'hybride intergénérique entre le blé et le seigle et pendant une interaction incompatible, la formation de papilles non pénétrées a été décrite comme une réponse prédominante de la résistance, alors que la HR agit comme une deuxième ligne de défense, pour priver le champignon de nutriments, si la résistance à la pénétration échoue (Troch *et al.*, 2014).

La complexité des polymères qui composent la lignine est à l'origine d'une résistance contre les enzymes de dégradation de la paroi produites par l'agent pathogène. Le processus de lignification intervient à plusieurs niveaux dans le cadre de la défense des plantes contre l'infection. La lignification peut également augmenter la résistance pariétale à la diffusion des toxines de l'agent pathogène vers l'hôte, mais aussi des nutriments provenant de l'hôte vers l'agent pathogène (Nicholson et Hammerschmitt, 1992). L'accumulation de la lignine et des composés phénoliques est considérée, au cours de l'interaction blé/*Fusarium gramineum*, comme un élément participant à la résistance de la plante (Mohammadi et Kazemi, 2002).

III. 1. 2. La callose

Associés aux dépôts de lignine et de composés phénoliques, des dépôts de callose sont également observés lors de la formation de papilles. Chez des céréales, comme l'avoine et l'orge, la callose est un élément prépondérant au niveau des papilles des cellules épidermiques (Zeyen *et al.*, 1993). La callose est un polymère de D-glucose reliés par des liaisons osidiques β -1,3 dont la synthèse est assurée par une enzyme de la membrane plasmique, la callose synthase (Lepoivre, 2003). La callose constitue ainsi une barrière physique à la pénétration du champignon (Aist *et al.*, 1991). Dans le cadre de l'interaction blé – *Mycosphaerella graminicola*, il a été mis en évidence une rapide accumulation de la callose chez le cultivar résistant Stakado après inoculation avec la souche IPO323, contribuant à l'arrêt de l'infection (Shetty *et al.*, 2009).

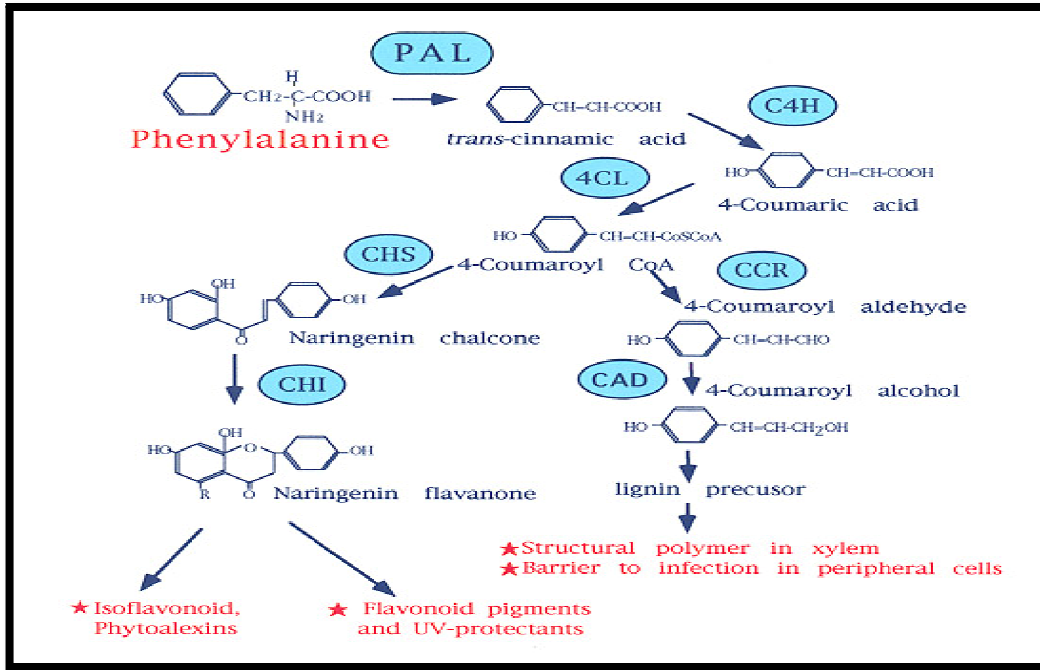


Figure 19: Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes:

PAL: phenylalanine ammonia-lyase, C4H: cinnamic acid 4 – hydroxylase, 4CL: 4 - coumaric acid CoA ligase, CHS: chalcone synthase, CHI: Chalcone isomerase, CCR: 4 - coumaroyl CoA reductase, CAD: coumaroyl alcohol dehydrogenase. Sriprasertsaket *et al.* (2002)

III. 1. 3. Les papilles

Mise en place des papilles

Lors de l'attaque de l'orge par *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* (*Bgh*), les cellules épidermiques des feuilles répondent à l'infection dès leur contact avec le TGP. Ainsi, au contact de la plante, la conidie émet un exsudat extracellulaire qui sera rapidement perçu par la plante et induira la mise en place des réponses de défense. Cet exsudat contient entre autre des cutinases qui vont induire de nombreuses modifications des cellules végétales (Pryce-jones *et al.*, 1999). Les cellules infectées produisent très vite des substances toxiques telles que des polyamines et du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Ces composés sont regroupés au sein de vésicules. La membrane externe de ces vésicules fusionne avec le plasmalemme des cellules épidermiques permettant ainsi à leur contenu d'être déposé dans la paroi des cellules. Les polyamines et l'H₂O₂ favorisent alors la formation de la papille (Zeyen *et al.*, 2002). Hückelhoven *et al.*, (1999) ont montré que la réussite d'une pénétration fongique de *Bgh* est en relation avec l'efficacité de la formation de la papille. Ainsi, l'élicitation via l'application d'acibenzolar-S-methyl (BTH) a induit la formation de papilles au niveau des cellules de l'épiderme et du mésophylle chez le riz qui limite l'infection par *Rhizoctonia solani* et provoque la dégénérescence des hyphes du champignon (Rohilla *et al.*, 2002). Ces papilles

sont classées en 3 catégories : (i) papilles inefficaces; à l'étape de pénétration, les papilles laissant la cellule attaquée vivante et le gène de résistance inefficace correspondant est *MLO*, (ii) papilles moyennement efficaces: les papilles des cellules qui subissent à la suite d'une HR faible et le gène de résistance correspondant est *Mlg* et (iii) papilles efficaces: une HR forte après la pénétration de la cellule épidermique hôte; le gène correspondant est *Mla12*. En plus, l'accumulation de H₂O₂ était plus forte avec les papilles sans haustorium (Hückelhoven *et al.*, 1999). Li *et al.* (2005) ont observé une forte accumulation d'H₂O₂ au niveau des papilles formées au site de pénétration de *Bgt* chez les variétés de blé sensibles et résistantes, cette accumulation était efficace dans les 2 cas pour empêcher la pénétration du champignon, soulignant ainsi l'importance de l'H₂O₂ comme réaction générale de défense contre l'oïdium.

La composition des papilles

Zeyen *et al.* (2002) ont conclu que les papilles étaient le lieu d'accumulation de peroxydases, de l'H₂O₂, de la callose, de composés phénoliques (la lignine) et d'une variété d'enzymes au pouvoir hydrolytique et antifongique important (Smart *et al.*, 1986; Carver *et al.*, 1991; Voigt, 2014). Le dépôt des composés phénoliques dans les papilles joue un rôle de barrière contre la pénétration du champignon (Chaure *et al.*, 2002). Carver *et al.* (1994) ont montré que l'inhibition de la synthèse de composés phénoliques par l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes importantes de la voie des phénylpropanoïdes (PAL et CAD) était corrélée à une diminution de l'auto-fluorescence des papilles et à une augmentation du taux de pénétration par *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* chez l'avoine. De plus, un composé de la famille des guanidines, la p-coumaroyl-hydroxyagmatine (p-CHA), est accumulé dans les papilles et impliqué dans l'efficacité des papilles pour stopper la pénétration du champignon. Le groupe des guanidines est important dans la résistance de l'orge d'une part, et d'autre part, grâce à son activité antifongique (Wei *et al.* 1994).

III. 2. Systèmes antioxydants

III. 2. 1. Glutathion-S-Transferase (GST)

Les plantes ont développé des mécanismes de défense efficaces contre les dommages oxydatifs induits par le stress. L'un d'eux repose sur les glutathion-S-transférases (GST, EC 2.5.1.18), des enzymes permettant l'utilisation du glutathion (GSH) comme substrat ou coenzyme. D'après les homologues de séquences, les GSTs des plantes sont réparties en 4 classes: Phi, Tau, Theta et Zeta, les deux premières sont spécifiques aux plantes et les deux

autres communes avec le règne animal (Edwards *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002). Le rôle le plus probable pour les GST dans des plantes infectées par des agents pathogènes serait d'inhiber la formation de la nécrose due à *Colletotricum orbiculare* chez le tabac *Nicotiana benthamiana* par détoxification des hydroperoxydes lipidiques et des FAO produites suite à la peroxydation des membranes (Dean *et al.*, 2005). L'activité GST joue donc un rôle dans la réduction des dommages causés par des agents pathogènes mais aussi en limitant l'étendue de la mort cellulaire au cours de la HR (Lieberherr *et al.*, 2003). L'induction de l'activité GST est en corrélation avec des concentrations croissantes de H₂O₂ (Venisse *et al.*, 2001). Un lien entre les GST et la tolérance à la vague oxydative a été démontré. Ces enzymes de protection agissent dans les cellules saines empêchant ainsi la mort cellulaire (Levine *et al.*, 1994). Dans le cadre d'une interaction incompatible blé-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, l'induction de l'expression du gène code pour la protéine GST1 suggère une implication de cette enzyme dans la résistance de la plante à limiter la formation de nécroses (Li *et al.*, 2011). Une augmentation de l'expression du gène *WIR5*, codant pour une GST, est observée chez le blé présentant une résistance locale induite contre *Bgt*, 2h après une pré-infection par *Bgh* (Dudler *et al.*, 1991).

Certaines GSTs de la famille phi et tau sont nécessaires pour le transport des pigments flavonoïdes vers la vacuole. Ce rôle non-catalytique assure la stabilisation et l'attachement des flavonoïdes ou d'hormones au niveau du cytosol avant leur dépôt dans la vacuole, contrôlant ainsi leur niveau (Edwards *et al.*, 2000).

III. 2. 2 L'activité catalase (CAT)

Pour lutter contre les dommages éventuels liés à la voie oxydative, il existe un système de défense mettant en jeu des enzymes comme la catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (Verma *et al.*, 2003). La CAT a été identifiée comme une enzyme protectrice contre les réactions de peroxydation (Monk *et al.*, 1989) en participant à la destruction des peroxydes toxiques (Lin *et al.*, 2000). L'activité CAT est liée à la présence de nombreuses isoformes contrôlées par différents gènes qui interviennent indépendamment en fonction du stress et, qui permettent ainsi à la plante d'adopter des réactions de défenses adéquates (Scandalios, 1990). Il a été montré par Kovács *et al.* (2011), une augmentation significative des plusieurs enzymes antioxydantes tels que les glutathione réductase, glutathione-S-transferase, catalase, ascorbate peroxidase et guaiacol peroxidase après 7 jours de l'infection du blé par *Bgt*. Les différents organes de la plante montrent alors que la CAT est une des enzymes essentielles qui intervient

au cours du stress oxydatif et qui confère à la plante une certaine aptitude face au stress (de Azevedo Neto *et al.*, 2005). Chez le maïs, Prasad *et al.* (1994) ont étudié plus précisément l'impact d'un traitement à l'H₂O₂ et en ont conclu qu'il était considéré comme un signal d'induction de l'expression des gènes codant pour la catalase

III. 3. Les protéines de défense

Les mécanismes de défense de la plante impliquent la synthèse de nombreux peptides et protéines de défense, parmi lesquelles les protéines PR, produites par la plante lors de l'interaction avec un agent pathogène (Tuzun et Somanchi, 2006). Les protéines PR, initialement découvertes chez le tabac (Gianinazzi *et al.*, 1970; van Loon et van Kammen, 1970) ont été répertoriées dans dix-sept familles (Tableau 2). Celles-ci incluent des isoformes basiques ou acides qui présentent des activités différentes (van Loon *et al.*, 2006). Les activités de toutes les protéines PR ne sont pas encore connues, mais la majorité d'entre elles présentent des activités antimicrobiennes. Ainsi les gènes codant pour les PR-1, à fonction encore inconnue (Alexander *et al.*, 1993 ; Tahiri-Alaoui *et al.*, 1993; Niderman *et al.*, 1995) sont fortement exprimés dans de nombreuses interactions plante-pathogène et sont souvent considérés comme des marqueurs de la SAR. Par ailleurs, les β -1,3-glucanases (PR2) et les chitinases (PR3, PR4, PR8 et PR11) sont des enzymes synthétisées par la plante et dont l'activité va conduire à la dégradation des parois fongiques (Tuzun et Somanchi, 2006) libérant ainsi des monomères de chitine et de glucane pouvant à leur tour agir comme des PAMP et déclencher de nouvelles réactions de défense (PTI) (van Loon et van Strien, 1999). A celles-ci s'ajoutent les PR-5, les osmotines, qui perturbent la perméabilité membranaire des agents pathogènes (Vigers *et al.*, 1992; Hu et Reddy 1997), les PR-6, des inhibiteurs de protéases (Ryan, 1990; Lorito *et al.*, 1994), ainsi que les PR-7, des endoprotéases qui seraient impliquées dans la dissolution des parois cellulaires microbiennes (van Loon *et al.*, 2006). D'autres protéines PR sont impliquées dans le métabolisme de l'auxine ou de l'éthylène, ou la formation de la lignine, à l'image des peroxydases ou PR-9 (Lagrimini *et al.*, 1987). Les PR-10, des N-glycosidases, sont capables d'inhiber la synthèse protéique chez les micro-organismes pathogènes (Stirpe *et al.*, 1992). A ces protéines PR, s'ajoutent également les défensines, les thionines et les LTP pour « Lipid Transfer Protein», respectivement PR-12, PR-13 et PR-14 qui possèdent des activités antifongiques, parfois antibactériennes voire même insecticides comme c'est le cas pour des défensines (Wijaya *et al.*, 2000 ; van Loon *et al.*, 2006). Chez les Monocotylédones, des protéines PR-15 et PR-16, des oxalate-oxydase, ont également été caractérisées. Elles sont à l'origine de l'accumulation d'H₂O₂ cytotoxique

pour les agents pathogènes et peuvent stimuler les réactions de défense de la plante (Donaldson *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003). Enfin, les PR-17 ont été récemment détectées chez le tabac, le blé et l'orge infectés par des agents pathogènes. Elles contiennent des séquences ressemblant aux sites actifs des métalloprotéinases (Christensen *et al.*, 2002) mais leurs fonctions n'ont pas encore été complètement caractérisées (van Loon *et al.*, 2006).

III. 3. 1. Les chitinases

Les chitinases (EC 3.2.1.14) sont des enzymes qui hydrolysent la chitine des parois cellulaires fongiques et inhibent la croissance des champignons. Deux catégories de chitinases sont différenciées: (i) des endochitinases, qui coupent la chitine au niveau des liaisons internes, ce qui donnera des polymères de N-acétyl glucosamine (GlcNAc) et des (ii) exochitinases, qui coupent la chitine progressivement à partir de la première liaison glycosidique en libérant des monomères de GlcNAc. De plus, les oligomères de chitine dégradée peuvent agir comme molécule signal pour stimuler des réactions de défense (Li *et al.*, 2001). Sept classes de chitinases de plantes ont été distinguées sur la base d'alignements de séquences et de leur distribution cellulaire (Neuhaus, 1999; Singh *et al.*, 2007). La plupart des chitinases isolées chez les céréales appartiennent aux chitinases de classes I et II (Muthukrishnan *et al.*, 2001). Les PR3 incluent des chitinases de classe I, II, IV, V, VI et VII. Les PR4 comprennent des chitinases de classe I et II ; les PR8 et PR11 sont des chitinases de classe III et I respectivement (van Loon et van Strien, 1999). Li *et al.* (2001) ont identifié, chez le blé, des chitinases de classes IV et VI. Singh *et al.* (2007) ont identifié une chitinase de class VII chez le blé.

La classe des chitinases I correspond à des chitinases basiques à pI élevé qui sont présentes dans les vacuoles. La classe des chitinases II acides se distingue par l'absence de domaine riche en cystéine. Elles sont localisées au niveau de l'apoplasme (Dore *et al.*, 1991). Les chitinases de la classe IV ne possèdent pas de domaine terminal riche en cystéine et s'accumulent dans le milieu extracellulaire (Collinge *et al.*, 1993). Les chitinases de classe VII sont des glycosyl hydrolases qui peuvent présenter une activité antifongique contre plusieurs agents pathogènes (Singh *et al.*, 2007). Cette chitinase de classe VII isolée chez le blé présente une activité antifongique *in vitro* contre un large spectre d'agents pathogènes tels que *Colletotrichum falcatum*, *Pestalotia theae*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Alternaria* sp. et *Fusarium* sp (Singh *et al.*, 2007).

L'infection du blé par *Fusarium graminearum* conduit à l'induction de l'expression des gènes codant pour des chitinases de classe IV et VII. Bien que l'amplitude de l'expression soit

similaire chez les cultivars sensible et résistant, la stimulation de l'expression de ces gènes est plus précoce chez les variétés résistantes (Li *et al.*, 2001). Au cours de l'interaction blé-septoriose, une augmentation de l'expression du gène *chi* codant pour une chitinase est observée entre 9 et 15 jours respectivement après infection chez un cultivar sensible (Shetty *et al.*, 2009). Chez le cultivar résistant, l'expression de ce gène est ponctuelle et précoce à 3 et 9 jours (Shetty *et al.*, 2009). La chitinase agirait directement sur le champignon pathogène par digestion de son haustorium (Toyoda *et al.*, 1991). Selon Kruger *et al.* (2003), la chitinase hydrolyse la chitine présente dans les parois cellulaires de *B. graminis* et empêche sa croissance.

III. 3. 2. Les glucanases

Les PR-2 sont des endoglucanases capables de couper les liaisons β -1,3-D-glucosidiques des β -1,3-glucanes présents dans les parois des champignons et des bactéries (Leubner-Metzger et Meins, 1999). Cawood *et al.* (2013) ont montré que chez le blé, un pré-traitement avec un extrait de la plante *Agapanthus africanus* de défense 48h avant l'infection par *Puccinia triticina* induit une réponse contre ce dernier, résulte en une augmentation de l'expression de gène *PR2* qui code pour (β -1,3-glucanase) par rapport au contrôle non-infecté.

III. 3. 3. Les peroxydases (POX)

Les POX se regroupent en trois classes: les POX intracellulaires (fongiques et végétales) de classe I, les POX fongiques de classe II et les POX végétales de classe III. Ces dernières utilisent l' H_2O_2 pour oxyder une large variété de donneurs d'hydrogène tels que les substances phénoliques, les amines, les acides ascorbiques, les indoles et certains ions inorganiques. Les gènes codant pour les POX forment des familles multigéniques largement répandues dans le règne végétal. Il a été montré que l'activité POX augmente chez un blé résistant à la rouille lors d'une infection par *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (Ivanov *et al.*, 2005). Lee et Hwang, (2005) et Choi *et al.* (2007), ont observé des micro-oxidative burst, des micro-HRs et une expression systémique de gènes codant pour une POX liée à la défense. Une protection des deuxièmes feuilles du poivre non-infectés a été obtenue pendant l'établissement de SAR en réponse à l'infection des feuilles primaires avec *Xanthomonas campestris* en augmentant l'activité de POX (Choi *et al.*, 2007). L'activité POX joue également un rôle important dans la protection locale chez les plantes, elle contrôle ainsi la mise en place de la réponse hypersensible (HR) déclenchée au cours de l'interaction entre l'orge et *Bgh* (Kruger *et al.*, 2003).

III. 3. 4. L'oxalate oxydase (OXO)

L'oxalate oxydase (OXO) est une enzyme qui utilise une molécule de dioxygène pour oxyder l'acide oxalique et libérer du CO₂ et de l'H₂O₂. L'H₂O₂ produit par l'OXO, toxique pour le champignon, favorise aussi dans les céréales la lignification des parois des cellules végétales, assurant ainsi des barrières généralisées contre les pénétrations fongiques (Lane, 2002). L'acide oxalique intervient dans les processus infectieux en séquestrant le Ca²⁺ et en acidifiant les parois cellulaires, facilitant ainsi leur dégradation par le champignon. Chez les céréales, l'induction des OXO est observée lors des interactions orge – *Bgh* et blé- *Bgt* (Bolwell et Wojtaszek, 1997). En effet, les OXO sont considérées comme étant des marqueurs de l'infection durant les interactions céréales-oïdium. Même en absence de HR, l'H₂O₂ peut, à lui seul, être un agent puissant contre l'invasion par des champignons pathogènes. La surexpression du gène *OXO* chez le tournesol rend la plante résistante à l'infection par *Sclerotinia sclerotiorum* (Hu *et al.*, 2003). De la même manière, l'enzyme OXO du blé surproduite chez le soja et le peuplier transformés confère à ces plantes une résistance vis-à-vis agents pathogènes producteurs d'acide oxalique, comme *Septoria musiva*, l'agent responsable du chancre septorien du peuplier (Liang *et al.*, 2001).

Tableau 2: Les familles de protéines PR (Van Loon *et al.*, 2006)

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β-1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococin-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

Rappel des objectifs de la présente thèse:

La symbiose mycorhizienne, et en particulier la symbiose mycorhizienne à arbuscules, qui concerne plus de 80% des plantes terrestres et la quasi totalité des plantes cultivées, permet à la fois une meilleure croissance et une meilleure résistance des plantes à de nombreux stress biotiques (Dalpé, 2005; Gianinazzi *et al.*, 2010; Pozo *et al.*, 2013) et abiotiques (Smith et Read, 2008 ; Debiane *et al.*, 2008; 2009; Campagnac *et al.*, 2010; Miransari *et al.*, 2010). Le potentiel des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) comme agents de biocontrôle a été décrit dans le cas de diverses infections racinaires (Khaosaad *et al.*, 2007; Fiorilliet *al.*, 2011; Castellanos-Morales *et al.*, 2012...) mais très peu dans la protection contre les maladies foliaires (Gallou *et al.*, 2011; Campos-Soriano *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Maffei *et al.*, 2014) et pas du tout dans le cas des pathogènes fongiques biotrophes. C'est pourquoi le travail réalisé lors de la présente thèse vise à :

1. Evaluer, en conditions contrôlées et en pots, l'éventuel effet protecteur de la mycorhization arbusculaire chez le blé contre *Bgt*.
2. Etudier les réactions de défense induites dans les feuilles blé mycorhizé par (i) des observations cytologiques (apposition de papilles fluorescentes, détection de peroxyde d'hydrogène, (H₂O₂)), (ii) des mesures d'activités enzymatiques (péroxydase (POX), lipoxigénase (LOX)) et (iii) l'analyse de transcrits (expression des gènes codant pour certains marqueurs de défense tels que la (LOX), la (POX), la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), le Non-expressor Pathogenesis-Related Proteins1 (NPR1) et une protéine à activité chitinase (CH11) « Pathogenesis-Related » (PR).
3. Optimiser l'effet protecteur de la mycorhization chez le blé en testant 3 facteurs pouvant influencer cet effet :
 - Apport en phosphore
 - Type d'inoculum mycorhizien
 - Niveau de résistance du cultivar de blé à *Bgt*.

Partie 2:

Matériels et Méthodes

I. Matériels

Matériels végétal et fongique

Les expérimentations ont été menées sur deux cultivars de blé tendre, *Triticum aestivum* L., Orvantis et Lord, respectivement peu sensible (5) et assez résistant (7)* à *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, agent de l'oïdium, *Bgt* (SYNGENTA seeds SAS). Pour les expériences en présence de l'agent pathogène, ces deux cultivars ont été infectés par la souche MPEBgt1 de *Bgt* (Cf. II.2)

Pour les inoculations par les CMA, trois types d'inoculum ont été utilisés:

1. *Rhizophagus irregularis* (*Ri*) DAOM 197198 (Walker et Schüßler, 2010), produit au sein de notre laboratoire à partir de plants de trèfle (*Trifolium repens* L.) inoculés et cultivés sur un mélange sable/perlite/vermiculite (2/1/1) stérilisé deux fois par autoclavage à 120°C et 1 bar pendant 20 minutes. L'inoculum récupéré au bout de 5 mois est formé de racines séchées et coupées en fragments d'environ 1 cm et mélangées avec le substrat qui contient également les propagules (hyphes et spores).
2. *Funneliformis mosseae* (*Fm*) (Walker et Schüßler 2010), produit par la Société MycAgro (Bretenière, France).
3. SOLRIZE® (SZE) constitué de *Glomus* sp. (Agrauxin, Beaucozé, France).

Ces deux derniers inocula sont constitués d'un mélange de racines mycorhizées, de propagules et de gravier.

La systématique du blé, de *Bgt* et des CMA utilisés au cours de cette étude est indiquée dans le tableau ci-dessous :

	La plante hôte: <i>T. aestivum</i> (APG III, Angiosperm Phylogeny Group, 2009).	L'agent pathogène: <i>B. graminis</i> (Speer, 1975)	Le CMA <i>R. irregularis</i> (Schüßler et Walker, 2010)	Le CMA <i>F. mosseae</i> (Schüßler et Walker, 2010)
Division:	Magnoliophyta	Ascomycota	Eumycota	Eumycota
Classe:	Liliopsida	Leotiomycetes	Glomeromycètes	Glomeromycètes
Ordre:	Poales	Erysiphales	Glomérales	Glomérales
Famille:	Poaceae	Erysiphaceae	Gloméracées	Gloméracées
Genre:	<i>Triticum</i>	<i>Blumeria</i>	<i>Rhizophagus</i>	<i>Funneliformis</i>
Espèce:	<i>aestivum</i> cultivar: Orvantis Lord	<i>graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	<i>irregularis</i>	<i>mosseae</i>

* : Echelle de tolérance à l'oïdium : Résistant 9-8 ; Assez Résistant 7-6 ; Peu Sensible 5-4 ; Assez Sensible 3-2 ; Sensible 1

II. Méthodes

II.1. Préparation du substrat et des cultures

Un mélange de sable, perlite et vermiculite (2 :1 :1, v :v :v) a été préparé, puis autoclavé. Les grains de blé (Orvantis et/ou Lord) sont préalablement pré-germés sur de la vermiculite humide pendant 2 jours. Puis, ces grains pré-germés sont transférés dans des pots (diamètre de 10 cm et capacité de 300 ml). Pour les plantes mycorhizées, un inoculum mycorhizien correspondant à 10% du poids total du substrat, est ajouté dans chaque pot. Pour les plantes témoins non mycorhizées, un inoculum mycorhizien autoclavé, est introduit de la même façon dans le substrat afin d'apporter la même quantité de matière organique à la plante. Les pots sont ensuite placés dans une chambre de croissance en conditions contrôlées: photopériode 12/12 (h), température 18/12 °C (jour/nuit) et 70% d'humidité.

Les plantes sont arrosées régulièrement avec de l'eau distillée et avec 50 ml de solution nutritive de Hoagland (tableau 3), par pot et par semaine. Les concentrations en phosphore (P) de cette solution varient en fonction des expérimentations menées (P, P/5 et P/10) avec [P] étant égale à 62 mg/L. Ce qui correspond à 73 kg de P/ ha, dose recommandée au champ pour la culture du blé tendre en France (Le Souder *et al.*, 1998).

Tableau 3 : Composition de la solution de Hoagland (Hoagland et Arnon, 1950)

Composés	Quantité (g/L)
Ca (NO₃)₂. 4H₂O	236.1
KNO₃	101.1
KH₂PO₄	136.1
MgSO₄. 7H₂O	246.5
Trace éléments compléter jusqu'à 1L	
H₃BO₃	2.8
MnCl₂. 4H₂O	1.8
ZnSO₄. 7H₂O	0,2
CuSO₄. 5H₂O	0,1
NaMoO₄	0,25
FeEDTA	
EDTA. 2Na	10.4
FeSO₄. 7H₂O	7,8
KOH	56,1

II. 2. Infection des plants de blé par l'oïdium (*B. graminis* f. sp. *tritici*)

La souche de *Bgt* (MPEbgt1) utilisée dans cette étude a été fournie par le Dr M.-P. Latorse de Bayer Crop Science (Lyon, France). Le champignon pathogène est produit sur des plants de blé dans une armoire de croissance séparée. Lorsque la sporulation est intense (10 jours après infection), les conidies sont prélevées à l'aide d'une pompe à vide et sont suspendues dans une solution de FC43 (heptacosafuorotributhylamine - 3M™ Fluorinert™ Liquide électronique, Cergy-Pontoise, France). Une suspension des conidies de *Bgt* calibrée à 5.10^5 spores/ml est utilisée pour infecter les parties aériennes des plants de blé âgés de 6 semaines. Un comptage du nombre de colonies/feuille des plants de blé a été réalisé 8 ou 11 jours après l'infection. Les observations cytologiques et la coloration par le DAB ont été réalisées sur des plantes contaminées par des suspensions de conidies ajustées à 6.10^5 et $7.5 \cdot 10^5$ spores/ml respectivement.

II. 3. Mesure des paramètres de croissance des plants de blé

Les parties aérienne et racinaire des plantes de chaque pot ont été prélevées afin d'évaluer l'effet des différentes concentrations de phosphore, de la mycorhization ou du cultivar de blé sur la croissance des plantes. Différents paramètres de croissance ont été mesurés: la taille, le nombre de feuilles et de tiges et la biomasse sèche des parties aérienne et racinaire. Ces mesures ont été effectuées sur cinq plants de blé par pot et trois pots par condition.

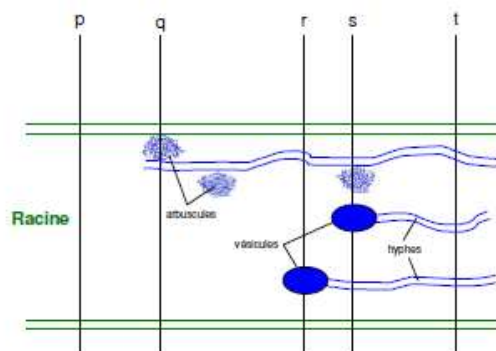
- a. La taille a été mesurée à partir du collet jusqu'à l'apex de la dernière feuille du brin principal.
- b. Le nombre de feuilles et de tiges /plante a été noté.
- c. Les poids secs des parties aérienne et racinaire de chaque pot ont été pesés après séchage dans l'étuve à 60°C pendant 48 h.

II. 4. Détermination des taux de mycorhization

La quantification de la colonisation racinaire du blé par le CMA a été réalisée après rinçage à l'eau distillée des racines, coloration au bleu Trypan 0.05% (0,5 g de bleu Trypan/L dans un mélange eau, glycérol et acide lactique (1:1:1 v/v/v)) pendant 1 heure à 70°C et éclaircissement dans une solution de KOH 10% (v/v) pendant 1 heure à 70°C (Phillips et Hayman, 1970). 100 fragments racinaires des 5 plantes issus du même pot ont été placés entre lames et lamelles et observés au microscope optique (x100). Les structures fongiques observées à l'endroit de l'intersection de l'axe de l'objectif et le fragment racinaire ont été

quantifiées (McGonigle et al. 1990). Trois lectures par fragment ont été réalisées, soit 300 lectures par traitement au total.

- p : aucune structure fongique.
- q: présence d'arbuscules.
- r: présence de vésicules.
- s: présence d'arbuscules et de vésicules.
- t: présence d'hyphes mycorhiziennes et absence d'arbuscules et de vésicules.
- g: nombre d'intersections.



Les taux de mycorhization total, arbusculaire et vésiculaire ont été déterminés grâce aux équations suivantes:

$$\text{taux total (T)} \\ H = 100 (g - p)/g$$

$$\text{taux d'arbuscules (A)} \\ A = 100 (q + s)/g$$

$$\text{taux de vésicules (V)} \\ V = 100 (r + s)/g$$

II . 5. Observation cytologique

La troisième feuille du maître-brin des plants de blé mycorhizés (M) et non mycorhizés (NM) et infectés par *Bgt* a été récoltée 48 heures après infection (hai). Pour décolorer les tissus et éliminer les pigments photosynthétiques, les feuilles ont été fixées dans un mélange éthanol: acide acétique (3:1) jusqu'à leur décoloration totale. Les structures fongiques sont ensuite colorées en utilisant 0,1% (w/v) de bleu Trypan. Les différents stades de développement de *Bgt* sont recherchés et comptabilisés: (i) conidies avec tube germinatif primaire (PGT pour Primary Germ Tube), (ii) présence de tube germinatif appressorial avorté (AGT avorté, pour abortive Appressorial Germ Tube) et (iii) AGT sans haustorium (HS) et (iv) avec HS. En outre, les papilles auto-fluorescentes, formées parfois en réponse à la pénétration par l'AGT, ont été également observées en utilisant un microscope à auto-fluorescence Eclipse E600 (Nikon, Corporation Japon, Tokyo) (excitation EX450-490 nm, émission DM505 nm). L'intensité de fluorescence des papilles a été classée en 3 catégories selon Carver *et al.* (1991) et Randoux *et al.* (2006): Classe 0: papille sans fluorescence. 1: papille faiblement fluorescente et 2: papille fortement fluorescente. La présence de cellules entièrement fluorescentes et la formation d'un HS, qui reflète la réussite de la pénétration d'un AGT, ont été également relevées. La fréquence des papilles fluorescentes (Fluorescent papillae FP) ont été estimées en comptabilisant le nombre de papilles fluorescentes x 100 / nombre de conidies avec AGT (Yokoyamai *et al.*, 1991).

II. 6. Détection de l'accumulation de H₂O₂

Pour détecter l'H₂O₂ dans les feuilles de blé, mycorhizé ou non avec les CMA et infectés par *Bgt*, la méthode de coloration au 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (1 mg/l dans 100 mM de citrate de sodium, pH 3,7) a été utilisée selon la méthode décrite par Thordal-Christensen *et al.*, (1997). Le DAB polymérise localement dès qu'il est en contact avec H₂O₂ en présence de la peroxydase, en donnant un polymère brun rougeâtre. Cette expérience a été réalisée sur des plantes âgées de 6 semaines. Les troisièmes feuilles ont été prélevées 17 hai par *Bgt* et la base de chaque feuille a été immergée dans une solution contenant 1 mg/ml de DAB dissous dans une eau acidifiée à pH 3,8. Les feuilles ont été maintenues dans cette solution pendant 4 heures, afin de permettre l'absorption du DAB. 21 hai, les feuilles ont été transférées dans un mélange éthanol: acide acétique (3:1) et laisser tremper au moins pendant 24 h pour décolorer les feuilles. Pour chaque condition observée, 15 morceaux foliaires d'une longueur de 1,5 cm ont été réhydratés dans l'eau distillée pendant 3 heures, puis stockées dans du lacto-glycérol (1:1:1, eau: acide lactique: glycérol). L'accumulation de H₂O₂ aux sites de pénétration de l'agent pathogène a été observée au microscope (G: x1000 ou x400). L'intensité de la coloration au DAB a été classée en 4 catégories. (i) Classe 0: cellules avec AGT sans coloration au DAB, (ii) classe 1: intensité faible de coloration, (iii) classe 2: intensité moyenne, (iv) classe 3, intensité forte. La fréquence de chaque évènement a été notée, en même temps que la présence ou l'absence de HS. La présence de cellules complètement colorées par le DAB a également été observée et comptabilisée.

II. 7. Estimation des activités enzymatiques

Après 6 semaines de culture, les activités peroxydase (POX) et lipoxigénase (LOX) ont été mesurées chez les plantes témoins (NM), mycorhizés (M), non mycorhizés et infectés par *Bgt* (NM+*Bgt*) et mycorhizés et infectés par *Bgt* (M+*Bgt*) 24 et 48 hai. Les feuilles ciblées pour le prélèvement correspondent à la troisième feuille du maître-brin de chaque plante (5 plantes/pot x3). Par la suite, 100 mg de poids frais foliaire (de 5 feuilles réunies), provenant du même pot ont été utilisés comme réplicat biologique. Les activités LOX ont été mesurées directement après prélèvement du matériel biologique alors que les activités POX ont été mesurées sur un matériel végétal conservé à -80 °C.

II .7. 1. L'activité POX

Le matériel biologique (100 mg de feuilles) a été broyé et homogénéisé dans 1 ml de tampon phosphate de potassium (100 mM, pH 7,0). Le surnageant est récupéré après

centrifugation (12 000 x g, 5 min, 4 °C) et gardé dans la glace jusqu'au dosage de l'activité. L'activité POX est ensuite mesurée en utilisant du 2,2'-azino-bis acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) comme donneur d'électrons selon la méthode de Mitchell *et al.*, (1994) légèrement modifiée. Le mélange réactionnel (1 ml par échantillon) se compose de 500 µM de ABTS, 250 µM de H₂O₂ à 35% dans un tampon acétate (25 mM, pH 4,4), et un volume adéquat de surnageant. Pour chaque condition, un témoin a été réalisé. Il est constitué de 5 µL de tampon d'extraction ou de surnageant pour l'échantillon végétale mélangé avec 995 µL de mélange réactionnel. La POX a été dosée par spectrophotométrie à 412 nm ($\epsilon = 32,400 \text{ /M/cm}$). Une cinétique de l'activité enzymatique a été suivie durant 5 min. L'activité spécifique a été exprimée en nkat/mg de protéines.

II .7. 2. L'activité LOX

L'activité de la LOX a été mesurée selon la méthode décrite par Renard-Merlier *et al.* (2007). La formation de diènes conjugués de l'acide linoléique (C18: 2), un substrat de LOX, est mesurée par spectrophotométrie à 235 nm pour évaluer l'activité LOX. Les tissus foliaires et racinaires sont broyés dans un tampon de phosphate de potassium (0,1 M, pH 7,6) contenant 9 mM d'octylthioglucopyranoside, 2% de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Le broyat est ensuite centrifugé à 10 000 g à 4 °C pendant 15 min. L'acide linoléique (C18: 2), substrat de la LOX, est préparé en dissolvant 20 µL de cet acide gras avec 100 µl de Tween 20 (CAS Uniqema Amer, NJ) dans 20 ml de 4 acide morpholinepropanesulfonique (MOPS), pH 7,0. Le mélange obtenu est ensuite incubé sous azote pendant 10 min à 22 °C. Le mélange réactionnel contient 286 µL de substrat et 28 µL de surnageant dans un volume final de 1ml de 50 mM de MOPS (pH 7,0). Une cinétique de l'activité enzymatique a été suivie pendant 5 min. ($\epsilon = 23. 10^3 \text{ /M/cm}$). L'activité spécifique a été exprimée en nkat/mg de protéines.

II .7. 3. Dosage des protéines

Les concentrations en protéines totales des extraits foliaires ont été déterminées grâce à l'utilisation du kit "Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification" (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), selon les instructions du fabricant. Les résultats obtenus des dosages enzymatiques provenant de trois expériences différentes répétées dans le temps.

II. 8. Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés à partir de 3 réplicats avec le logiciel Statgraphics 5.2.11.0 (Manugistic Inc., Rockville, MD, USA). Les résultats des données quantitatives ont été décrits par leur moyenne et leur écart-type. Les différences entre les différentes conditions ont été déterminées avec le test des comparaisons multiples (ANOVA à 1 facteur) et l'analyse des variances avec le test non paramétrique LSD ($p \leq 0,05$). Pour normaliser les données des taux de mycorhization, initialement exprimées en pourcentage, celles-ci ont été transformées en coordonnées angulaires (arc sinus de la racine carrée: $p' = \arcsin \sqrt{p}$), afin de pouvoir réaliser le test LSD ($p \leq 0,05$). La différence entre les comparaisons binaires a été déterminée avec le test de Fisher ($p \leq 0,05$).

Partie 3:

Résultats & Discussions

Article 1

**Arbuscular mycorrhizal inoculation induced wheat to
powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)**

**G. Mustafa, N.G. Khong, B. Tisserant, B. Randoux, J. Fontaine,
M. Magnin-Robert, Ph. Reignault, A. Lounès-Hadj Saharaoui**

Soumis dans New Phytologist

Présentation de l'article 1

Problématique - objectif

Le blé est la deuxième céréale la plus consommée par l'Homme après le riz. Cette culture céréalière importante peut être soumise aux attaques de *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), champignon ascomycète biotrophe responsable de l'oïdium. La lutte contre ce parasite nécessite l'utilisation de cultivars résistants et l'application intensive et systématique de fongicides. Afin de réduire l'usage d'intrants chimiques, nocifs pour l'Homme et son environnement, le développement d'une agriculture plus durable est devenu une priorité, aussi bien pour les pouvoirs publics que pour les scientifiques. Parmi les méthodes alternatives de protection des plantes pouvant être mises en place, le biocontrôle occupe désormais une place de choix. Ce dernier consiste à utiliser des organismes naturellement antagonistes des agents phytopathogènes, ou bien capables de stimuler les défenses naturelles des plantes, comme les CMA.

A ce jour, le potentiel des CMA dans la protection des plantes a été décrit le plus souvent dans le cas d'infections racinaires, mais très peu dans les maladies foliaires. De plus, l'effet protecteur des CMA a été rapporté dans le cadre d'interactions plantes/champignons hémibiotrophes et nécrotrophes, mais pas du tout dans le cas des agents fongiques biotrophes comme celui responsable de l'oïdium du blé.

C'est pourquoi, l'objectif du premier article de cette thèse vise à mesurer l'éventuel effet protecteur de l'inoculation mycorhizienne par *Funneliformis mosseae* (*Fm*) contre *Bgt* en stimulant les défenses naturelles du blé (*Triticum aestivum*). Ce travail a été mené en pots et en conditions contrôlées. Ce travail a consisté à :

1. Déterminer les paramètres de mycorhization du blé en présence de l'inoculum *Fm*. Cet inoculum a été choisi car plus de 50% des études sur l'effet protecteur de la mycorhization ont été réalisées avec le genre *Glomus*, en particulier avec l'espèce *F. mosseae* (synonyme *Glomus mosseae*) (Vierheilig *et al.*, 2008).
2. Evaluer l'effet de la mycorhization sur la croissance et l'infection du blé;
3. Etudier les éventuelles réactions de défense induites chez le blé mycorhizé par (i) des observations cytologiques (apposition de papilles fluorescentes, détection de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène, (H₂O₂)), (ii) des mesures d'activités enzymatiques, peroxydase (POX), lipoxygénase (LOX) et (iii) l'analyse de

transcrits via l'expression des gènes codant pour certains marqueurs de défense impliqué dans l'interaction blé-oïdium tels que la *POX*, la chitinase (*CH11*), la phénylalanine ammonia-lyase (*PAL*) (Tayeh *et al.*, 2015), la Non-expressor Pathogenesis-Related Proteins 1 (*NPR1*) et la *LOX* (Khong *et al.*, 2013).

Résumé des principaux résultats

Après 6 semaines de culture en présence de l'inoculum mycorhizien *Fm*, un taux de mycorhization de 38% dans les racines de plants de blé et une amélioration de la croissance (biomasses sèches racinaire et foliaire) ont été obtenues. De plus, un taux de protection contre *Bgt*, estimé à 78%, a été observé sur les feuilles des plants de blé mycorhizés. Les observations cytologiques ont révélé une réduction du nombre de conidies formant un tube germinatif appressorial associé à un haustorium dans les cellules épidermiques des feuilles des plants de blé mycorhizés. En outre, une accumulation de composés phénoliques et de H_2O_2 au niveau du site de pénétration de l'agent pathogène *Bgt* a été observée. Les suivis d'accumulation de transcrits, par RTqPCR, ont montré une surexpression des gènes *POX*, *PAL*, *CH11* et *NPR1* codant pour des marqueurs des réactions de défense dans les feuilles de plants de blé mycorhizés, et ce uniquement en absence de l'agent pathogène.

L'ensemble de nos résultats démontrent que la protection obtenue contre l'oïdium du blé en réponse à l'inoculation mycorhizienne pourrait constituer une Résistance Induite par la Mycorhization (ou MIR pour l'anglais Mycorrhiza-induced resistance). Dans nos conditions, les mécanismes associés à la MIR ont réduit le développement de *Bgt* et induit une élicitation de type systémique plutôt qu'une potentialisation (« priming ») des défenses dans les feuilles des plants de blé mycorhizés.

Arbuscular mycorrhizal inoculation induced resistance in wheat to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)

G. Mustafa, N.G. Khong, B. Tisserant, B. Randoux, J. Fontaine, M. Magnin-Robert, Ph. Reignault, A. Lounès-Hadj Saharaoui*

Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Université du Littoral Côte d'Opale, 50, rue Ferdinand Buisson, F-62228 Calais cedex, France.

Summary

- In order to develop a more sustainable agriculture using alternative control strategies, the biocontrol ability of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Funneliformis mosseae* (*Fm*), to protect wheat against the biotrophic phytopathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) was evaluated.
- After 6 weeks of culture in pots, mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) plants were infected by *Bgt*. The impact of *Fm* on wheat growth was first evaluated, then plant protection and defense induction were investigated in leaves.
- In parallel to a significant 38% M rate, increases in both root and shoot biomasses were obtained and *Bgt* infection was reduced by 78% on M wheat leaves. Cytological observations revealed that *Bgt* haustorium formation in epidermal leaf cells of M wheat was reduced, and phenolic compounds and H₂O₂ were accumulated at the penetration site. Transcripts analyses demonstrated an up-regulation of *POX*, *PAL*, *CHI1* and *NPR1* genes in M wheat, in the absence of the pathogen only.
- We demonstrated here a protection of wheat against *Bgt* in response to *Fm* inoculation, which could be related to a Mycorrhiza Induced-Resistance (MIR). Our findings suggest that MIR-associated mechanisms impaired *Bgt* development process and induced a systemic elicitation rather than a primed state in wheat leaves.

Keywords: arbuscular mycorrhiza fungi, wheat, powdery mildew, biocontrol, mycorrhiza induced-resistance

Introduction

Wheat is the most widely cultivated cereal in the world, with a production about 705 million tons in 2015 (<http://www.igc.int>), accounting for 30% of the global produced cereals. Unfortunately, this crop is attacked by a range of foliar fungal diseases. Among them, powdery mildew is caused by the ascomycete fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), which leads to white powdery spots appearance on wheat leaves and stems. *Bgt* is a biotrophic fungus widely distributed throughout the world, particularly in humid regions. It is responsible for severe yield losses (about 30%) associated with early infections of highly susceptible cultivars (Briceño-Felix *et al.*, 2008). Synthetic fungicides that are commonly used to control this disease cause both human health problems (reprotoxicity, neurotoxicity and carcinogenicity) and environmental pollutions (Oruc, 2010). Using alternative control strategies, compatible with a more sustainable agriculture, became an urgent need to reduce the systematic use of fungicides. Among biological methods, inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) could constitute a potential alternative of biocontrol for crop diseases (Singh *et al.*, 2012). AMF are able to establish symbioses with over 80% land plant species (Smith & Read, 2008), conferring several benefits to host plants (Smith *et al.*, 2010). They improve the plant nutritional status as well as their resistance against biotic and abiotic stress (Miransari *et al.*, 2010) such as drought (Subramanian *et al.*, 2006, Ruiz-Lozano *et al.*, 2006), salinity (Daei *et al.*, 2009) and pollution (Hildebrandt *et al.*, 2007; Debiane *et al.*, 2009; Campagnac *et al.*, 2010).

Concerning biotic stress, the induction by AMF of plant resistance against soil-borne pathogens has been described in previous studies (Whipps 2004; Pozo *et al.*, 2013 for review; Hayek *et al.*, 2014), but their role in protecting plant against foliar diseases caused by fungal pathogens remains scarce and controversial.

Several studies revealed that the relationships between above-ground pathogens of different lifestyles and AMF are complex. In the case of hemibiotrophic pathogens such as *Colletotrichum orbiculare* in cucumber colonized by *Rhizophagus irregularis* (Lee *et al.*, 2005) or *Funneliformis mosseae* (Chandanie *et al.*, 2006), and *Phytophthora infestans* in potato plants colonized by *Glomus* sp (Gallou *et al.*, 2011), the impact of AMF varies from no effect to significant reductions of the infections. Concerning infection by necrotrophic pathogens such as *Botrytis cinerea* or *Alternaria solani*, it was shown to be reduced in mycorrhizal tomato plants colonized by *F. mosseae* or *R. irregularis* (Fritz *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2009; Fiorilli *et al.*, 2011). Conversely, some biotrophic pathogens were shown to be

overall more virulent in leaves of mycorrhizal plants. Dugassa *et al.* (1996) reported that *Oidium lini* infection increased in flax plants colonized by *R. irregularis*. Similarly, Gernns, (2001) showed that mycorrhizal barley colonized by *Glomus etunicatum* was more susceptible to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, whereas Larsen *et al.* (2004) did not observe any protection against *Podosphaera xanthii* in cucumber plants mycorrhized by *R. irregularis*.

The establishment of arbuscular mycorrhizal symbiosis involves remarkable changes in the physiology of the host plant roots (Kothari *et al.*, 1990; Chatzistathis *et al.*, 2013). In non-mycorrhizal tomato root parts of mycorrhizal split-root system, a systemic induced resistance was observed against *P. parasitica* proliferation, resulting from elicitation of host wall thickenings containing (non-esterified pectins) and PR-1a protein in reaction to penetration attempt of intercellular pathogen hyphae (Cordier *et al.*, 1998). Likewise, this bioprotective systemic effect can be observed in the leaves of mycorrhizal plants through stimulation of various defense responses in the host plant. The protective effect observed on the leaves of cucumber colonized by *R. irregularis* was related to the enhancement of callose formation at the penetration site of *C. orbiculare* (Lee *et al.*, 2005). In mycorrhizal *Medicago truncatula* plants, the expression of many genes involved in plant defenses was induced in shoot tissues in comparison to non-mycorrhizal plants, suggesting a systemic induced response from roots to shoots (Liu *et al.*, 2007). Furthermore, a systemic induction of regulatory defense-related genes was described in leaves of mycorrhizal rice plants in parallel to a gain of plant resistance against the hemibiotrophic pathogen *Magnaporthe oryzae* (Campos-Soriano *et al.*, 2012). Pozo and Azcon-aguilar, (2007) suggested that the observed protection was related to a mycorrhizal induced resistance (MIR) which was described to operate with the same mechanism leading to the priming of plant defense induced systemic resistance (ISR). ISR is defined as an enhanced defensive capacity of the entire plant against a broad spectrum of pathogens. That is acquired upon local induction by beneficial microbes, such as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) or fungi (PGPF) (Pieterse *et al.*, 2014). ISR has been described as involving jasmonic acid (JA)/ethylene (ET)-dependent signalling pathway (Ahn *et al.*, 2007, Stein *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2014). Unlike, Systemic Acquired Resistance (SAR), which was shown to depend on salicylic acid (SA) production and signalling, provides long-lasting and broad-spectrum resistance in uninfected parts, in response to a challenge by a pathogenic agent (Ryals *et al.*, 1994; Kachroo & Robin, 2013).

Our work is the first one which described AMF as a biocontrol agent targeting wheat-powdery mildew. It aimed firstly to establish the potential protective effect of arbuscular mycorrhizal inoculation against wheat powdery mildew and to evaluate the impact of

arbuscular mycorrhizal inoculation on wheat growth. Secondly, some mechanisms involved in mycorrhiza-induced defense in wheat leaves were investigated at three levels: cytological observations (auto-fluorescence associated with papillae formation), enzymatic activities (peroxidase and lipoxygenase) and transcripts analysis. The qRT-PCR analysis focused on the expression of genes involved in wheat defenses, such as genes encoding for a pathogenesis-related protein peroxidase (*POX*), lipoxygenase (*LOX*), phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), chitinase1 (*CH11*) and Nonexpressor of Pathogenesis-Related Proteins1 (*NPRI*).

Materials and methods

Biological Material

Wheat (*Triticum aestivum*) cultivar Orvantis (Benoîts C.C., Orgerus, France) was used in this study. This cultivar is considered as susceptible to wheat powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), exhibiting an estimated field resistance level 5 on a 1 to 9 scale. Seeds were pre-germinated on moist vermiculite for 2 days and then transplanted into pots (300 ml capacity) to grow in a controlled growth chamber at 12-18°C night/day, a 12h-12h photoperiod and 70% humidity.

Experimental design and inoculation by AMF

Pots were filled with a sand, perlite and vermiculite (2:1:1) mixture, sterilized twice (120°C and 1 bar for 30min). *Funneliformis mosseae* (*Fm*) (Schüßler & Walker, 2010) was used as AMF inoculum (MycAgro Ltd, France).

Autoclaved substrate was supplemented with inoculum (10% of total quantity) before deposition of germinated seeds. Non-Mycorrhizal plants (NM) were supplemented with equivalent amounts of autoclaved inoculum, in order to provide the plants with the same organic substances as Mycorrhizal (M) plants. Plants were irrigated with 50 ml pot⁻¹ of a Hoagland's nutrients solution (Hoagland & Arnon, 1950) and with distilled water as necessary.

Pathogen Infection

The *B. graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) MPEbgt1 isolate used in this study was kindly provided by Dr M.-P. Latorse from Bayer Crop Science (Lyon, France). The fungus was maintained on wheat plants in a separate room culture until heavily sporulating. Healthy wheat seedlings were infected with 10 days-old *Bgt* conidia that were collected by vacuum extraction from fully sporulating leaves and suspended in FC43 (heptacosafuorotributylamine, Fluorinert™

Electronic Liquid, 3M, Cergy-Pontoise, France). The suspension concentration was adjusted to 5.10^5 spores ml^{-1} except for the microscopic observation test and for DAB staining, where the conidial suspensions were adjusted to 6.10^5 and $7.5 \cdot 10^5$ spores ml^{-1} respectively. Leaves were sprayed with conidia suspension ($0.5 \text{ ml}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) when plants were 6 week-old. *Bgt* symptoms appeared 8 days after infection (dai), and the number of colonies leaf^{-1} of wheat plants was counted either on all the infected leaves or the 3rd leaf only.

Determination of plant growth parameters

After 6 weeks of culture, plant length, leaf and stem numbers were noted for each plant. Shoot and root dry biomasses were harvested and then dried in a hot air oven at 60°C for 48 h until constant weight. Three distinct pots were used as biological replicates for each treatment, considering every pot as a sample ($5 \text{ plants pot}^{-1}$).

Determination of arbuscular mycorrhizal root colonization rate

All events related to AMF root colonization, namely internal hyphae, arbuscules and vesicles were visualized after 6 weeks of culture by microscopy observation on Trypan blue-stained roots. Wheat plant roots were washed with distilled water to remove the small amount of strongly adhering sand. They were cleared in KOH 10% solution (v/v) for 1 hour at 70°C , then stained with Trypan blue (0.5 g l^{-1}) in water, glycerol and lactic acid mixture (1:1:1, v/v/v) for 1 hour at 70°C (Phillips & Hayman, 1970). The root pieces were stored in a water/glycerol/lactic acid (1:1:1, v/v/v) solution. Root colonization rate was calculated using the grid line intersect method (McGonigle *et al.*, 1990). One hundred root fragments from 15 plants sampled from three different pots ($5 \text{ plants pot}^{-1}$) were observed under an optical microscope (x100). Three intersections per root fragment were examined. In total, 300 observations per treatment are analyzed. The total (T), arbuscular (A) and vesicular (V) mycorrhizal rates were estimated.

Cytological investigation of *Bgt* growth and auto-fluorescence detection

The third leaf of NM and M wheat plants infected with *Bgt* was harvested 48 hours after infection (hai), cleared in ethanol: acetic acid solution (3:1, v/v) then stained using 0.1% (w/v) Trypan blue. Different developmental stages of *Bgt* were monitored: conidium with primary germ tube (PGT), abortive appressorial germ tube (Abortive AGT), and AGT without and with haustorium (HS). Conidia with HS formation and branched hyphae were also observed 72 hai. In addition, auto-fluorescent papillae, formed in response to penetration of AGTs,

were observed using an Eclipse E600 (Nikon, Corporation Japon, Tokyo) (excitation EX450-490 nm, DM505, BA520 nm transmittance range, x1000 or x400). Fluorescence intensity of papillae was recorded on a 0–2 scale modified from Carver *et al.* (1991) by Randoux *et al.* (2006), with class 0: no visible fluorescence; 1: weak fluorescence and 2: strong fluorescence. The presence of whole fluorescent cells was also monitored.

Light microscope detection of H₂O₂

Detection of hydrogen peroxide (H₂O₂) was carried out using the DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining method according to Thordal-Christensen *et al.* (1997). The infection by *Bgt* was applied on 6 week-old plants. The third leaves were excised 17 hai and the cut end was immersed in a solution containing 1mg ml⁻¹ DAB dissolved in water (pH 3.8 with HCl). The leaves were kept in this solution, allowing DAB uptake for 4 hours. Twenty one hai, DAB staining intensities of NM plants were compared to those of M plants. DAB-treated leaves were then transferred in acetic acid-ethanol (1:3, v/v) to fix the DAB staining and bleach the leaves from chlorophylls. These leaf pieces of 1.5 cm-length, sampled from 5 plants, were soaked in water for 3 hours and then stored in lactoglycerol (water: glycerol: lactic acid, 1:1:1, v/v/v). Accumulation of H₂O₂ at the site of pathogen penetration was observed with an Eclipse E600 (Nikon, Corporation Japon, Tokyo) (x1000 or x400). A staining intensity scale was designed to evaluate the intensity of H₂O₂ accumulation (Randoux *et al.*, 2010): (i) class 0, the AGT penetrated the epidermal cell but there was no visible DAB staining, (ii) class 1, weak DAB staining intensity, (iii) class 2, average staining intensity, (iv) class 3, strong staining intensity. The presence of whole cell DAB staining was also monitored.

RNA extraction, quantitative RT-PCR analysis and gene expression

After 6 weeks of culture, expressions of defense-related genes were monitored in M and NM plants infected or not by *Bgt* (5.10⁵ spores ml⁻¹). Plant third leaves were sampled at 0, 12 and 21h after infection (hai), and the same sampling procedure was also conducted in non-infectious conditions. Sampled leaves were frozen in liquid nitrogen to halt enzymatic activities and stored at -80°C prior to use. Total RNA was extracted from 100 mg of frozen tissues using RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, The Netherlands). Genomic DNA contaminating the samples was removed by treatment with the RNase-Free DNase Set (Quiagen, The Netherlands). Total RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm, 2 µg were reverse-transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

(Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol. Expression of targeted genes selected from previous studies (*PAL*, *LOX* and *CHII*, Tayeh, 2012; Tayeh et al., 2013) and newly designed ones (*NPRI* and *POX*) was assessed by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) using the primers listed in Supplemental Table 1. Primers of the *NPRI* and *POX* genes were designed using the Primer Express program and were tested for secondary structure using the Net Primer program. Reactions were carried out in a real-time PCR detector ABI Prism 7300 apparatus (Applied Biosystems, USA) using the SYBR green master mix (Applied Biosystems, USA) and the following thermal profile: 15s at 95°C (denaturation), 30s at 60°C (annealing) and 30s at 72°C (extension) for 40 cycles. PCR reactions were performed in triplicate for three independent samples. They were normalized with the housekeeping gene ACT. The analysed genes were considered as significantly up- or down-regulated when changes of their expression were ≥ 2 X or ≤ 0.5 X.

Supplemental Table 1. Genes analyzed by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction

Gene	Primer sequences	Genbank accession number	PCR primer efficiency (%)
<i>ACT</i> (actin, housekeeping gene)	5'-AACCTTCAGTTGCCAGCAA-3' 5'-TGTTGCGACCGCTGGCATAAC-3'	AB181991	97.7
<i>PAL</i> (phenylalanine ammonia lyase)	5'-CCCCATTGGTGTCTCCAT-3' 5'-ACTGCGCGAACATCAGCTT-3'	AY005474	92.7
<i>LOX</i> (lipoxygenase)	5'-GGGCACCAAGGAGTACAAGGA-3' 5'-GCTCGTGATGGTGTGGATGA-3'	U32428	100.0
<i>POX</i> (peroxidase)	5'-CACCACACCACTCCACCAGTAA-3' 5'-AGCACCACAAGAGAAAGGCAAG-3'	X56011.1	95.0
<i>CHII</i> (chitinase 1)	5'-GCCACGTCCCCACCATACTAT-3' 5'-CCGGCAAGATCGTAGTTGGA-3'	AB029934	90.0
<i>NPRI</i> (non expressor of pathogenesis related gene 1)	5'-TGTGCTGGACAAGATCATGGA-3' 5'-TCCTTGCCAAAGCAACTCG-3'	AX351145	96.0

Enzymatic Activities

After 6 weeks of culture, peroxidase (POX) and lipoxygenase (LOX) activities were assessed in M and NM plants infected or not by *Bgt*. These activities were then measured 24 and 48 hours subsequently to the infection. The third leaf from 5 plants was collected; 100 mg of fresh leaf were taken for immediate LOX assay and the same amount was kept in liquid nitrogen then transferred into -80 C° freezer for POX activity assay.

LOX (EC 1.13.11.12) activity was measured in leaf tissues according to Todd *et al.* (1990) and Avdiushko *et al.* (1993), with slight modifications according to Randoux *et al.* (2010).

For POX (EC 1.11.1.7) activity, foliar fragments were crushed and homogenized in 1ml of ice-cold 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. Particulate materials were removed by centrifugation (12,000 × g, 5 min, 4°C). The supernatant was kept at 4°C and then it was diluted 2 times for leaf enzyme extract. POX was assayed colorimetrically using 2,2'-azino-

bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as the electron donor at 20°C according to the method of Mitchell *et al.* (1994) with slight modifications. The reaction mixture consisted of 500 µM ABTS, 250 µM H₂O₂ in 25 mM acetate buffer (pH 4.4), and the suitable volume of crude enzyme extract. The formation of the radical cation was rapidly monitored at 412 nm ($\epsilon = 32,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Protein content in the enzyme extracts was measured using the method of Lowry *et al.* (1951). The standard curve was established with bovine serum albumin (BSA, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) for the estimation of protein content. Three independent experiments were analyzed.

Statistical Analysis

Overall, three distinct pots – each one contains 5 plants – were used as biological replicates for each treatment. Data were analyzed statistically by mean comparison by the least significant difference (LSD) test using Statgraphics release 5.1 software (Manugistic, 278 Inc., Rockville, MD, USA). Standard deviations were calculated by Microsoft Office Excel 2007 for all the data in this paper. Percentages were converted to arcsin values before the analysis of ANOVA and LSD test.

Results:

Wheat root mycorrhizal rates after inoculation by *Fm*

The efficiency of *Fm* mycorrhizal inoculation was determined by measuring wheat root colonization rate after 6 weeks of culture. While no arbuscular mycorrhizal structures in the roots of NM wheat plants (control) were detected, intraradical hyphae, arbuscules and vesicles were extensively observed in roots of plants grown in the culture substrate-supplemented with *Fm* inoculum (M wheat plants). Total, arbuscular and vesicular colonization rates were estimated to 38, 19 and 17% respectively in the roots of M wheat plants (Table I).

Table I. Root colonization rates of Mycorrhizal (M) wheat plants after 6 weeks of culture. Results were obtained from two independent experiments. Observations were carried out on 100 root fragments from 15 plants sampled from three different pots.

Root mycorrhizal rate (%)	M
Total	38
Arbuscular	19
Vesicular	17

Impact of arbuscular mycorrhizal inoculation on wheat growth

To evaluate the impact of arbuscular mycorrhizal inoculation on wheat growth, different parameters (plant length, leaf and stem number, root and shoot dry weights) were measured in M and NM wheat plants after 6 weeks of culture. Results, presented in Table II, showed that shoot and root biomasses increased in M plants by about 9 and 45% respectively compared to NM plants. However, no significant differences were obtained for plant lengths, leaf and stem numbers between M and NM wheat plants (Table II).

Table II. Impact of mycorrhizal inoculation on plant growth after 6 weeks of culture. Values are means \pm standard deviation. Results were obtained from two independent experiments and each one corresponds to 15 plants sampled from three pots. One asterisk indicates a statistically significant difference between Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) wheat plants according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

Wheat growth parameters	NM	M
Plant length (cm)	39.24 \pm 2.09	38.38 \pm 2.17
Leaf number plant ⁻¹	6.73 \pm 0.82	7.13 \pm 0.99
Stem number plant ⁻¹	1.63 \pm 0.62	1.88 \pm 0.68
Shoot dry weight (mg5 plants ⁻¹)	1020 \pm 80	1120 \pm 70*
Root dry weight (mg5 plants ⁻¹)	240 \pm 80	440 \pm 50*

Reduction of wheat infection by *Bgt* in response to arbuscular mycorrhizal inoculation

After 6 weeks of culture, M and NM plants were infected by *Bgt*. The number of colonies on infected leaves and on the 3rd leaf only were counted at 8 dai. About 96 and 21 *Bgt* colonies were recorded on NM and M wheat leaves, respectively (Table III). The corresponding protection rate was estimated to about 78% in M wheat plants compared to NM ones. Results obtained specifically on the 3rd leaf were similar and protection rate was estimated to about 71% (Table III).

Table III. Impact of AM inoculation on wheat infection by *Bgt* (5.10^5 spores ml⁻¹). Infection test was performed on 6-week-old wheat and colonies were counted 8 dai. *: indicates a significant difference between the number of colonies on Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) wheat plant leaves according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Values are means \pm standard deviation. The results were obtained from two independent experiments and each one corresponds to 15 plants sampled from three pots.

	NM	M
Number of colonies leaf ⁻¹	96 \pm 44	21 \pm 8*
Number of colonies 3 rd leaf ⁻¹	99 \pm 35	28 \pm 10*

Cytological investigation of *Bgt* infection process

In order to investigate the impact of wheat mycorrhizal inoculation on *Bgt* infectious process, its different developmental stages (conidia with PGT, abortive AGT, AGT without and with HS, AGT with HS formation and branched hyphae) were observed by microscopy 48 hai on M and NM wheat epidermal leaf cells (Table IV). Our results showed that there was no significant difference between PGT (Fig. 1a) percentages on M and NM wheat, whereas abortive AGT (Fig. 1b) were 10 fold more frequent on M plant leaves compared to the NM ones. The percentage of AGT without HS formation (Fig. 1c) was 1.4 fold higher within wheat epidermal leaf cells of M plants. In contrast, the percentage of AGT with HS (Fig. 1d) was 2 fold lower in leaf cells of M plants compared to NM ones. AGT with HS formation and branched hyphae were also observed at 72 hai (Fig. 1e). This fungal developmental stage decreased by 5 fold in wheat epidermal leaf cells of M plants compared to NM ones (Table IV).

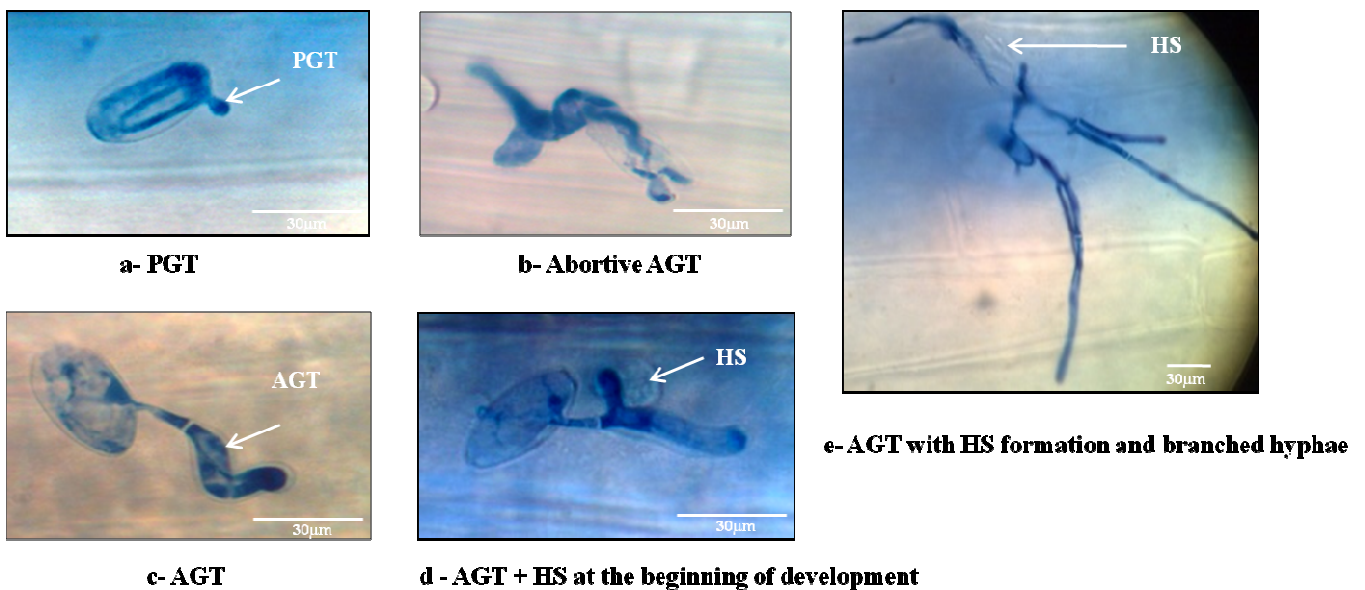


Fig. 1: Microscopic observations of different stages of *Bgt* development (6.10^5 spores ml^{-1}) in epidermal leaf cells of Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) wheat plants. PGT: primary germ tube; AGT: appressorial germ tube; HS: haustorium. Stages a, b, c and d were observed 48 hai, whereas stage e was observed 72 hai. All events were observed on the 3rd leaf from 5 distinct plants.

Table IV: Percentages of the different developmental stages of *Bgt* conidia (6.10^5 spores ml^{-1}) in epidermal leaf cells of both Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) wheat plants. PGT: primary germ tube; AGT: appressorial germ tube; HS: haustorium. All events were observed on the 3rd leaf from 5 distinct plants. One asterisk indicates a statistically significant difference between M and NM wheat plants according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

Conidia developmental stage		Event (%)	
		NM	M
48 hai	PGT only	9.28	8.62
	Abortive AGT	1	10.34*
	AGT without HS	41.23	57.76*
	AGT with HS	48.45	23.27*
72 hai	AGT with branched hyphae and HS formation	40	8*

The occurrence of auto-fluorescent papillae was monitored and their fluorescence intensity was classified in three categories: class 0: no fluorescent papillae seen beneath AGT (Fig. 2a); class 1: weakly fluorescent papillae (Fig. 2b); class 2: strongly fluorescent papillae (Fig. 2c). An additional event, whole-fluorescent cells, was also monitored (Fig. 2d). For each category, the presence of HS was also recorded. Percentages of each event are presented in Fig. 3. No fluorescent papillae class was more frequently observed in leaf cells of NM plants compared to M plants, irrespective of the presence or the absence of HS. Excepted for weakly fluorescent papillae with HS, the percentage of fluorescent papillae was more important in epidermal leaf cells of M plants compared to NM ones, particularly in the absence of HS (35% in M plants compared to 6% in NM ones for weakly fluorescent papillae class). Moreover, whole-cell fluorescence was mainly observed on M plants (10%) compared to NM plants (1%) (Fig. 3).

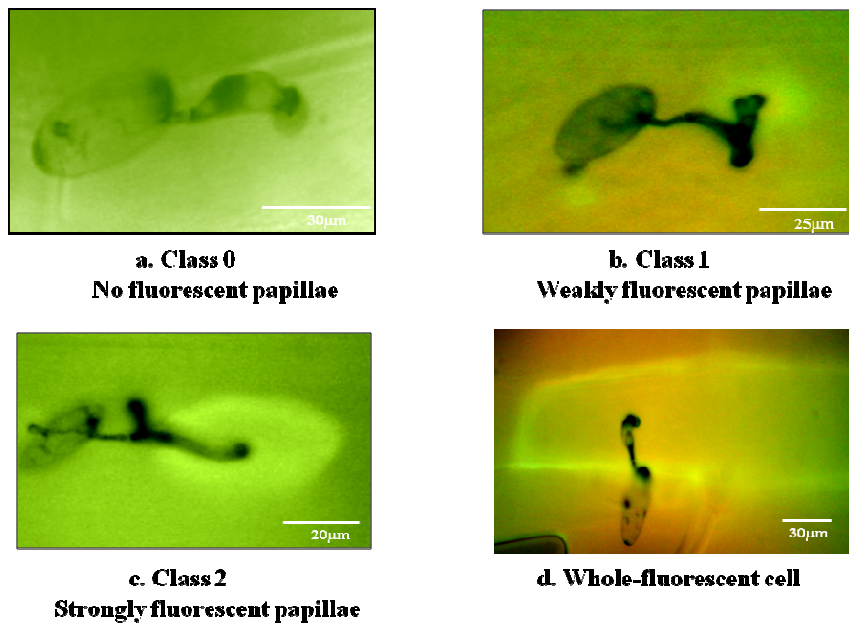


Fig. 2: Localized auto-fluorescence associated with the formation of papillae at the *Bgt* penetration sites of *Bgt* (6.10^5 spores ml^{-1}) in wheat epidermal leaf cells. All events were observed 48 hai on the 3rd leaf from 5 distinct plants.

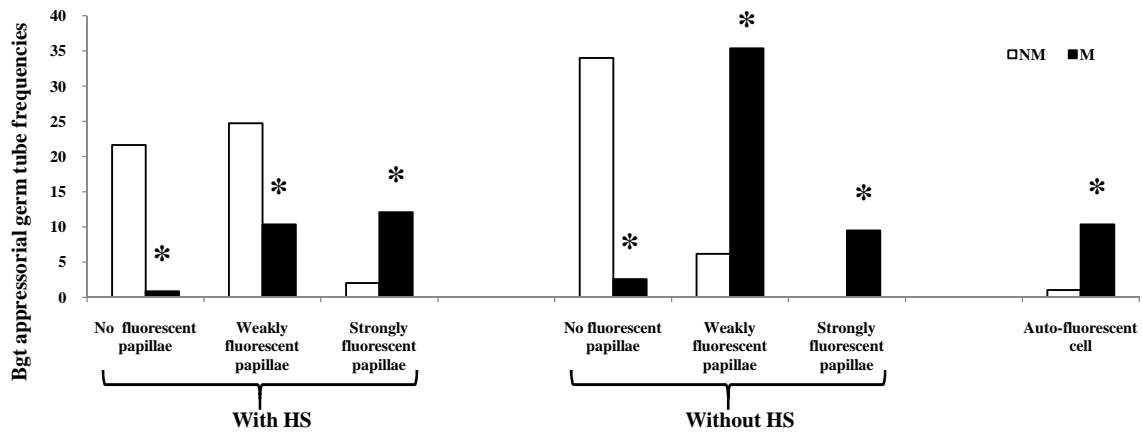


Fig. 3: Frequencies of AGT associated with auto-fluorescence at penetration sites of *Bgt* (6.10^5 spores ml^{-1}) in wheat epidermal leaf cells with and without HS of both Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) wheat plants. All events were observed 48 hai on the 3rd leaf from 5 distinct plants. One asterisk indicates a statistically significant difference between M and NM wheat plants according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

Cytochemical detection of H_2O_2 accumulation at *Bgt* conidia penetration sites

Upon infection of wheat leaves by *Bgt*, H_2O_2 accumulation in the epidermal cell wall beneath AGT was monitored within 21 hai by reddish-brown staining due to DAB polymerization (Fig. 4). DAB staining was classified in four categories as follow: class 0: no visible DAB staining (Fig. 4a), class 1: weak DAB staining intensity (Fig. 4b). Class 2: average staining

intensity (Fig. 4c) and class 3: strong staining intensity (Fig. 4d). Whole cell DAB staining was also observed (Fig. 4e). The presence of HS was also monitored (Fig. 5).

In NM plants, most of *Bgt* AGT penetration events led to no visible DAB staining or weak DAB staining in the wheat epidermal leaf cells, especially in the presence of HS. On the contrary, in M plants, 25% of the events led to an average intensity of staining and 12% to a strong intensity, in association with the absence of HS. Moreover, whole cell DAB staining was observed only in epidermis of M plants leaves (11%).

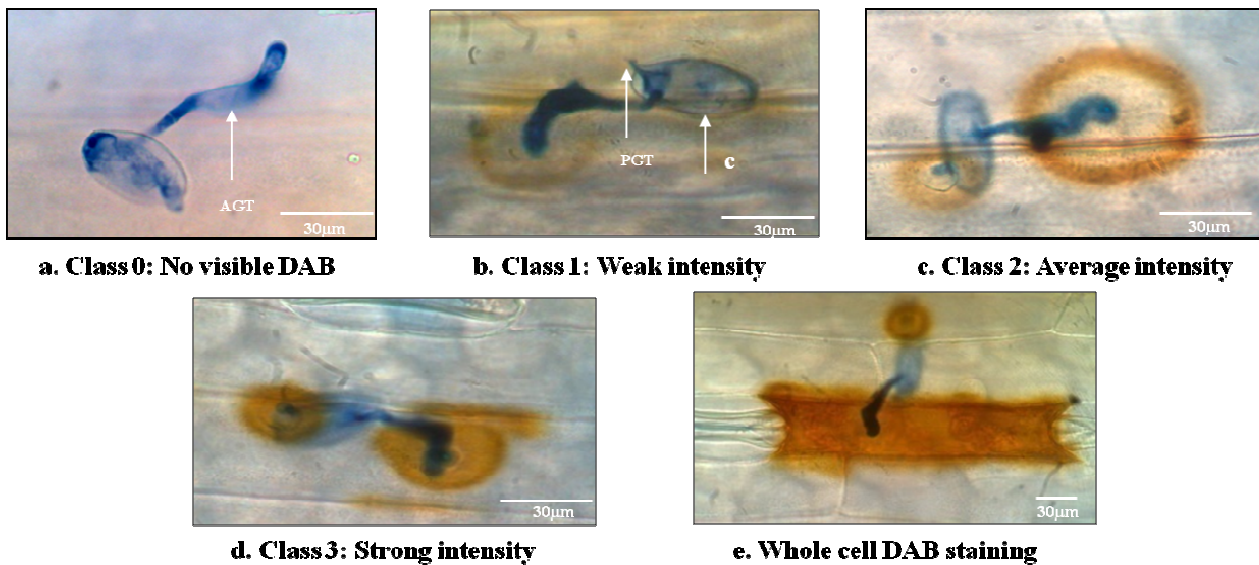


Fig. 4: H₂O₂ accumulation at AGT penetration sites of *Bgt* (7.5×10^5 spores ml⁻¹) in wheat epidermal leaf cells of both Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) plants visualized after DAB staining. C: conidium; PGT: primary germ tube; AGT: appressorial germ tube. All events were observed 21 hai on the 3rd leaf from 5 distinct plants

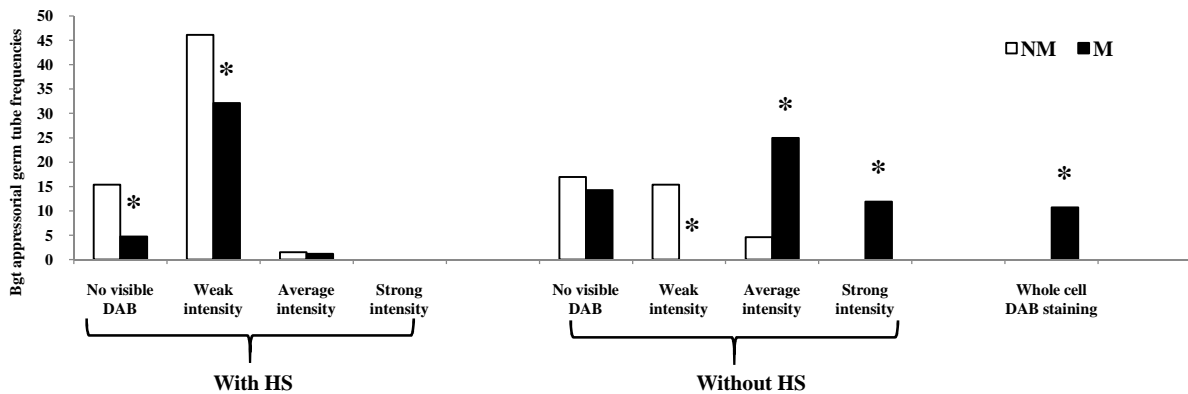


Fig. 5: Frequencies of AGT with DAB staining at the penetration sites by *Bgt* (7.5×10^5 spores ml⁻¹) in wheat epidermal leaf cells with and without HS of both Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) plants. All events were observed 21 hai on the 3rd leaf from 5 distinct plants. One asterisk indicates a statistically significant difference between M and NM wheat plants according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

Effect of *Bgt* infection on expression pattern of defense-related genes in leaf tissues of mycorrhizal and non-mycorrhizal wheat plants

After *Bgt* infection, *PAL*, *POX*, *CHII* and *NPRI* expressions were up-regulated in NM wheat leaves at 12 or/and 21 hai in our conditions (Fig. 6a,c,d,e). The highest induction was observed for the *POX* expression, with 24-fold and 3.2-fold at 12 hai and 21 hai, respectively (Fig. 6c), compared to the corresponding control (NM wheat in non-infectious conditions). A similar trend was observed for the expression of *CHII* (Fig. 6d), with lower induction values of 7.4- and 3-fold at 12 and 21 hai compared to the control, respectively. *NPRI* expression was induced during the infection time course, with 3.4- and 8.4-fold at 12 and 21 hai, respectively (Fig. 6e). *PAL* expression appeared to be significantly 2.1-fold up-regulated later, at 21 hai (Fig. 6a). In M wheat infected by *Bgt*, the expression pattern of target genes appeared as very different to that observed in NM wheat. Indeed, no up-regulation of *PAL*, *POX*, *CHII* or *NPRI* expressions was observed during fungal infection. On the contrary, *POX* was repressed at least 2.5-fold at 12 and 21hai compared to M wheat in non-infectious conditions. Likewise, *PAL* and *CHII* were also repressed, at 12 hai by 2.4-fold for *PAL* and at 21 hai by 2.9-fold for *CHII* (Fig. 6a,d). In the case of *LOX*, a slight and transient induction (2.2-fold) was observed at 12 hai, followed by a repression (2.1-fold) at 21 hai in comparison to M wheat in non-infectious condition (Fig. 6b). Moreover, the expression of *NPRI* was not affected in leaves of mycorrhizal wheat infected by *Bgt*.

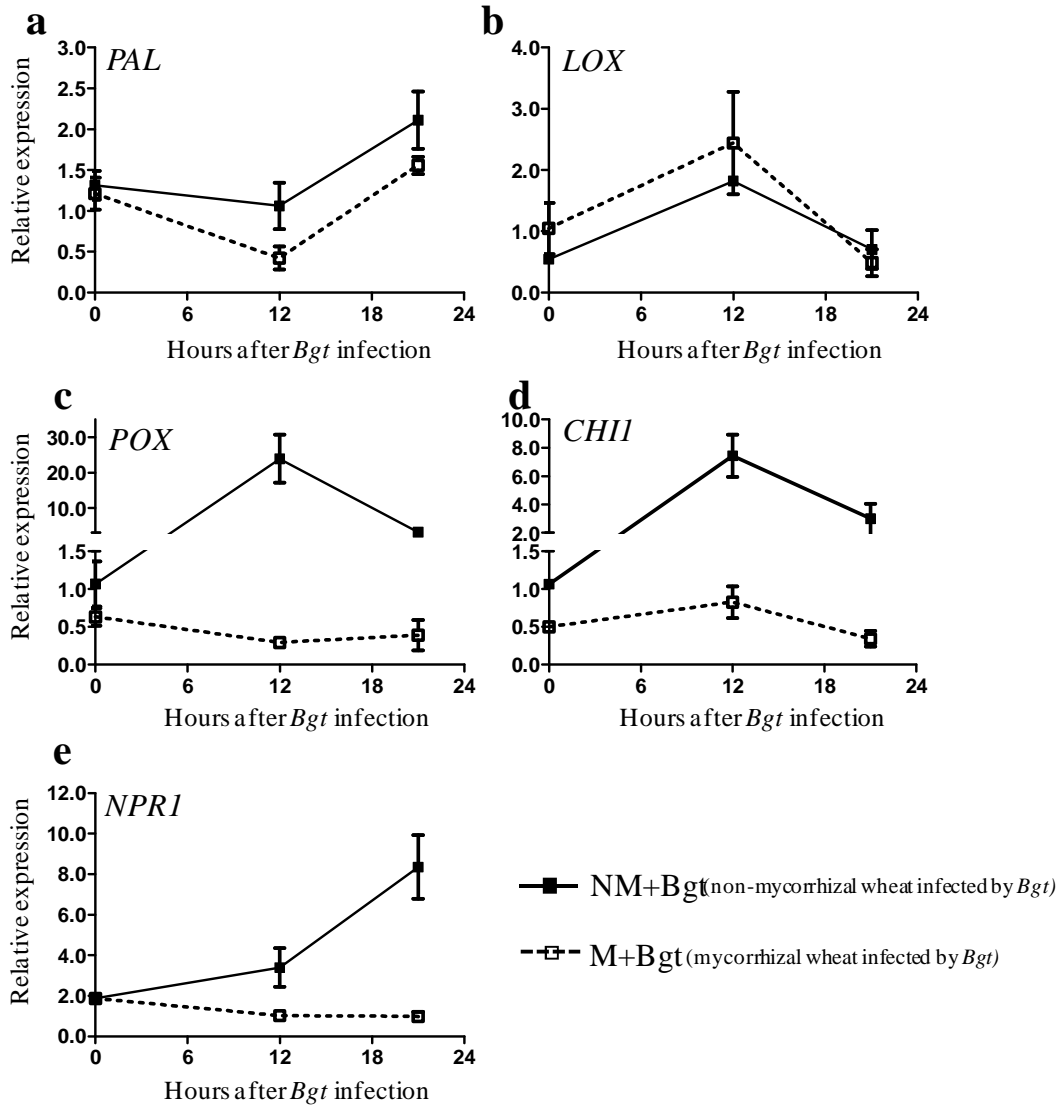


Fig. 6: Effect of *B. graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) infection on gene expression of *PAL* (a), *LOX* (b), *POX* (c), *CHI1* (d) and *NPR1* (e) in leaf tissues of mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) wheat. *Bgt* ($5 \cdot 10^5$ spores ml^{-1}) infection was performed on 6-week-old M and NM wheat and the 3rd leaf were sampled at 0, 12 and 21h post-infection. Gene expression was performed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Results are normalized to the act in gene expression. Gene expression at each time point is represented relative to the non-infectious control for NM wheat (NM+Bgt curve) or for M wheat (M+Bgt curve), respectively. PCR reactions were performed in triplicate for three biological independent samples of one experiment. Results correspond to the means (\pm standard deviation). Gene expression was considered as significantly up- or down-regulated to the 1x control, when changes in relative expression were $\geq 2x$ or $\leq 0.5x$, respectively.

Impact of mycorrhizal inoculation on expression pattern of defense-related genes in leaf tissues of wheat infected or not with *Bgt*

After 6 weeks of wheat culture in the presence of AMF, the expression of *PAL*, *POX*, *CHI1* and *NPR1* in leaves was at least 2-fold induced compared to the NM plants in non-infectious conditions (Fig. 7). No modification of *LOX* expression in leaves of M wheat was observed with or without *Bgt* infection (Fig. 7). No additional effect on the induction of defense-related genes was observed in leaves of M plants in response to *Bgt* attack (Fig. 7). On the contrary, the combination of mycorrhizal inoculation and pathogen infection led to a down-expression of *POX* and *NPR1* at 12 (16- and 3.6-fold) and at 21 hai (2.8- and 2.4-fold) (Fig. 7). In the case of *PAL* and *CHI1* genes, the inducing effect of mycorrhizal inoculation described above on wheat leaves was not observed after *Bgt* infection (Fig. 7).

	non-infectious conditions	infectious conditions	
		12 hai	21 hai
<i>PAL</i>	2.06	1.17	0.8
<i>LOX</i>	1.32	0.49	1.35
<i>POX</i>	5	0.06	0.35
<i>CHI1</i>	4.6	0.64	0.62
<i>NPR1</i>	3.4	0.28	0.42




Fig. 7: Effect of wheat arbuscular mycorrhizal inoculation on the relative expression of 5 selected genes (*PAL*, *LOX*, *POX*, *CHI1* and *NPR1*) in non-infected and *Bgt*-infected plants. After 6 weeks of culture in the presence of AMF inoculum, wheat plants were infected or not by *Bgt* ($5 \cdot 10^5$ spores ml^{-1}). The color scale bars represent the ratio values corresponding to the mean of three independent samples. Genes down- or over-expressed appear in shades of gray, with lowest and highest expression (≤ 0.05 and ≥ 10 , respectively) in bright gray, and unchanged expression compared to control in white. Gene expression was measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, in (i) non-infectious conditions (gene expression is represented relative to NM wheat) and in (ii) infectious conditions (gene expression is represented relative to NM+*Bgt* wheat). Gene expression was considered as significantly up- or down-regulated to the 1x control, when changes in relative expression were $\geq 2x$ or $\leq 0.5x$, respectively.

Effect of mycorrhizal inoculation and/or *Bgt* infection on *POX* and *LOX* activities in wheat leaves

In order to find out enzymatic mechanisms involved in wheat resistance against *Bgt* in mycorrhizal plants, two enzyme markers involved in plant defense pathways, *i.e.* *POX* and

LOX activities, were assessed in leaves of NM and M wheat plants in non-infected and infected conditions.

In wheat leaves, basic POX activity was higher in M plants than in NM plants (Fig. 8a). In NM plants, *Bgt* infection increased leaf POX activity from 24 hai by 20%. However, in M plants, *Bgt* infection didn't induce any change in leaf POX activity, whether 24 or 48 hai.

In M plants, leaf LOX activity was lower than in NM plants in non-infectious conditions. After *Bgt* infection, no change in LOX activity was detected in wheat leaves either in M plants or NM plants, compared to their controls (Fig. 8b).

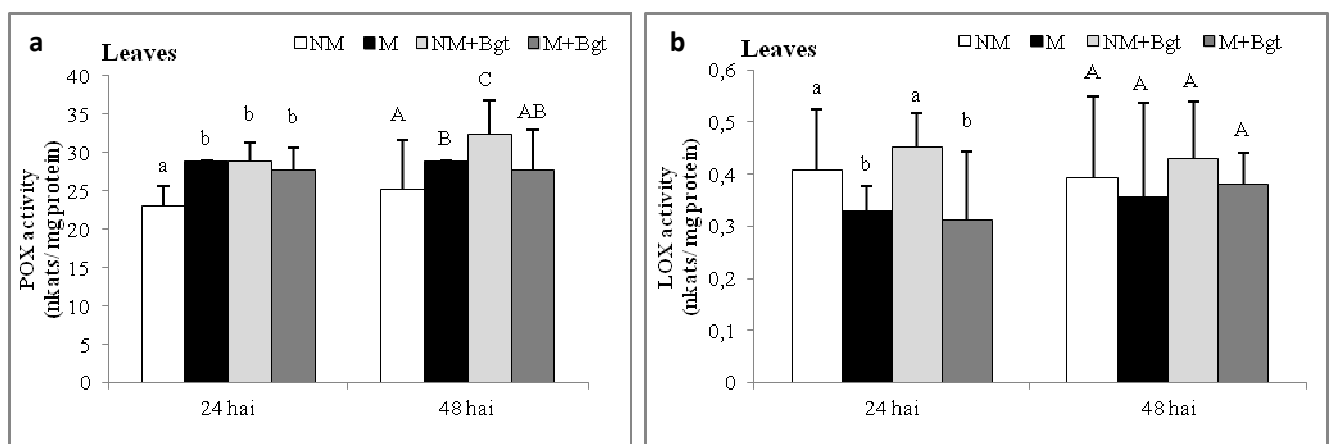


Fig. 8: Effect of *Fm* mycorrhizal inoculation and *Bgt* infection ($5 \cdot 10^5$ spores ml^{-1}) on POX (a), LOX (b) activities in leaves at 24 and 48 hai by *Bgt*. NM: Non-Mycorrhizal and non-infected plants; M: *Fm* Mycorrhizal and non-infected plants; NM+Bgt: Non-Mycorrhizal and *Bgt*-infected plants; M+Bgt: Mycorrhizal and *Bgt*-infected plants. Values are means \pm standard deviation. Results were obtained from three independent experiments. In each experiment, the 3rd leaf of 15 plants sampled from three pots, was used. Column headed by different letters indicate statistically significant differences between the different conditions at a given day according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

Discussion

The present study showed that arbuscular mycorrhizal inoculation with *Fm* induces, in controlled pot conditions, a significant and a systemic 78% protection against the biotrophic fungal pathogen *Bgt*. Such a result has never been reported so far in the case of the wheat/*Bgt* pathosystem, and more generally for biotrophic foliar pathogens. However, similar observations were made in other pathosystems. Indeed, infections by necrotrophic pathogens such as *B. cinerea* or *A. solani* were reduced in mycorrhizal tomato plants colonized by *F. mosseae*, *R. irregularis* or *Glomus fasciculatum* (Fritz *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2009; Fiorilli *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 2015). Plant protection by mycorrhizal inoculation was also described in

the case of hemibiotrophic pathogens such as *C.orbiculare* in cucumber plants colonized by *R. irregularis* (Lee *et al.*, 2005) and *P. infestans* in potato plants colonized by *Glomus* sp (Gallou *et al.*, 2011). In our conditions, a total M rate of 38% was obtained after 6 weeks of culture after the addition of the arbuscular mycorrhizal bioinoculant. Such a finding agrees with previous study of Azcon & Ocampo (1981), who reported 35% of root colonization in wheat mycorrhized by *F. mosseae* species after 10 weeks of culture in pots. The reduction of *Bgt* infection by *Fm* inoculation suggested that wheat root colonization may play a role in the protection obtained against *Bgt*.

One of the first mechanisms proposed for mycorrhizal-induced protection was the improvement of plant nutrition and compensation of the damages caused by the pathogen through increasing plant growth (Fritz *et al.*, 2006). Indeed, our results showed that *Fm* wheat inoculation enhanced root and shoot wheat biomasses. Similar increases of biomass were reported for many crops such as barley, onion, soybean, rice, blackgram, clover and tomato inoculated with different AMF (Owusu-Bennoah & Mosse, 1979; Bagyaraj *et al.*, 1979; Kuo & Hung, 1982; Joner & Leyval, 2001; Rizvi, 2015).

Arbuscules, as the exchange sites of the symbiosis, are known to regulate the delivery of P and N from the AMF to the host plant (Bucking & Shachar-Hill, 2005; Hammer *et al.*, 2011), leading to enhanced water and nutrition absorption and subsequently plant growth. *Fm* arbuscular rate of wheat root reached 19% in our conditions.

However, the protective effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis observed in our study cannot be regarded as just a consequence of improved nutrition (Fritz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Other mechanisms, such as plant defense responses, may intervene in this protection. Although previous works reported systemic resistances induced by AMF against above-ground phytopathogens, corresponding defense mechanisms were rarely described (Fiorilli *et al.*, 2011; Miozzi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Maffei *et al.*, 2014). The protective effect of *Fm* inoculation against *Bgt* obtained in our study may result from mycorrhizal-induced resistance (MIR). MIR confers foliar protection against a wide range of hemibiotrophic and necrotrophic fungal pathogens (Lee *et al.*, 2005; Campos-Soriano *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2014). This mechanism locally and systemically sensitizes plant tissues and boosts their basal defense in response to both root and leaf pathogens. It was associated with priming rather than elicitation of plant defense responses Pozo & Azcon-aguilar (2007); indeed, Campos- Soriano *et al.* (2012) suggested also a systemic activation of defense genes in the absence of pathogen in leaves of mycorrhizal rice.

Cytological analysis was performed by microscopic observations to compare *Bgt* infectious process, as well as local defense expression in leaves of M and NM wheat. No difference in the frequency of conidia with PGT only was observed between M plants and NM ones, suggesting that resistance induced by *Fm* does not impair initial steps of conidia germination. A similar lack of mycorrhizal effect on spore germination of *C. orbiculare* sprayed on mycorrhized cucumber leaves was observed in the case of *R. irregularis* (Lee *et al.*, 2005). Nevertheless, AGT - with haustorium - formation was found to be drastically less frequent in leaves of M plants compared to control. Haustorium formation is a crucial factor for the feeding of the fungal pathogen and for its later successful reproduction (Hückelhoven *et al.*, 1999). In the present study, this reduction was associated with a higher percentage of fluorescent papillae at the AGT penetration sites in epidermal leaf cells, but also with an increase of DAB-staining intensities in papillae, suggesting a H₂O₂-mediated impairing of penetration. Previous chemical analyses allowed to identify the composition of epidermal cell papillae, which includes lignin, cell wall polymers, callose, reactive oxygen species (ROS), and cell wall proteins such as peroxidases (Voigt, 2014). Auto-fluorescence under UV light excitation points the presence of phenolic compounds out, which can be involved in cell-wall reinforcement at sites of attempted penetration (Hückelhoven *et al.*, 1999; Aist *et al.*, 1988), and the presence of H₂O₂ in papillae is a biochemical marker that distinguishes non-penetrated from penetrated cell walls during barley or wheat/powdery mildew interactions (Hückelhoven *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005; Troch *et al.*, 2014). The importance of defense activation at the site of fungal penetration in leaves of M plants was also mentioned by Lee *et al.* (2005). The authors observed that the priming of callose deposition during fungal penetration seems to be the mechanism involved in the plant protection against *C. orbiculare*. Moreover, the presence of whole auto-fluorescent cells, as well as whole DAB-stained cells, was more frequent in leaves of M wheat plants compared to NM ones among the sites of attempted penetration. This recalls incompatible interactions features, where an active and rapid death of attacked epidermal cells, corresponding to hypersensitive response (HR), can be visualized by whole-cell auto-fluorescence under UV excitation in barley (Görg *et al.*, 1993; Hückelhoven *et al.*, 1999) as well as whole cell accumulation of H₂O₂ at the sites of infection (Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Hückelhoven *et al.*, 1999). Taken together, our results suggest that mycorrhizal inoculation resulted in the triggering of papillae formation and HR-like events in wheat in response to powdery mildew infection. It is likely that MIR is expressed in foliar tissues through cytological events which have not been investigated before.

Moreover, in non-infectious conditions, the root inoculation by *Fm* resulted in a significant activation of peroxidase activity and up-regulation of a class III POX-encoding gene, that belongs to the PR-protein 9 subfamily (van Loon *et al.*, 2006). Class III peroxidases are known to play a role in plant defense responses through the oxidation of several substrates at the expense of H₂O₂ (Almagro *et al.*, 2009). Li *et al.* (2013) described a release of H₂O₂ in parallel to the stimulation of plant antioxidant activities for plant cell protection, in soybean leaves of plant colonized by *R. irregularis* under non-infectious conditions. These results suggest an elicitation of defenses in leaves in M plants, recalling some SAR features. According to Lee & Hwang, (2005) and Choi *et al.* (2009), significant microoxidative bursts, micro-HRs and a systemic expression of defense-related genes such as a POX-encoding gene, were observed in secondary non-infected leaves during SAR establishment in pepper, in response to infection of primary leaves with an avirulent strain of *Xanthomonas campestris*. Similarly to *POX* gene, up-regulations of *CHII*, *PAL* and *NPR1* genes were also observed in response to root inoculation by *Fm* in the absence of *Bgt* infection. These results confirmed a modulation of plant defense induction during AMF symbiosis (Liu *et al.*, 2007; Pozo *et al.*, 2009; Campos-Soriano *et al.*, 2012). Various studies described an eliciting effect of M inoculation on leaf tissues under non-infectious conditions, via a stimulation of PR-proteins gene expression (Liu *et al.*, 2007; Gallou *et al.* 2011; Song *et al.*, 2011). *Fm* treatment enhances the expression of a gene encoding for a vacuolar chitinase (*CHII*). Vacuolar chitinases are known to degrade newly synthesized chains of chitin, eventually repressing fungal growth (Kasprzwska, 2003; Kaku *et al.*, 2006). The *CHII* gene was previously known to be induced in two resistant wheat cultivars infected by *Mycosphaerella graminicola* during the incompatible interaction (Adhikari *et al.*, 2007). An important and rapid induction has been observed in the early hours of fungal infection, during the biotrophic phase of *M. graminicola*. Transcripts accumulation of *CHII* gene in leaves of M wheat under non-infectious conditions may contribute to an effective and/or rapid plant response, restricting the fungal infection processes at the first hours of *Bgt*-wheat interaction. Similarly, the increase of *PAL* transcripts accumulation in M wheat may lead to a faster stimulation of *PAL* enzymatic activity in leaves of M wheat plants in response to an upcoming pathogenic fungi infection. The induction of this enzyme may be involved in the biosynthesis of antimicrobial compounds, as well as in providing the cell with precursors for lignin synthesis, which increase plant resistance (Pellegrini *et al.*, 1994; Polle *et al.*, 1994). Indeed, we described above the ability of M wheat to increase the frequencies of the fluorescent papillae observed on leaves during *Bgt* infection. *PAL* is also a key enzyme in the

synthesis of SA. In addition to the induction of «typical» defense genes, Campos-Soriano *et al.* (2012) indicate that AMF symbiosis is accompanied by a systemic alteration in the expression of genes playing a regulatory role in the host immune system. Genes regulated in SA-dependant (OsNPR1) or JA-dependant (OsJAmyb and OsMPK7) manner were up-regulated in leaves of M rice plants. In wheat leaves, the up-regulation of SA-dep *NPR1* may indicate a systemic modulation of gene expression by M interaction through the involvement of SA. JA pathway and more generally oxylipin pathways have received special attention in our study, through the analysis of corresponding gene expression and enzymatic activity in leaf tissues of M wheat plants. The lipoxygenase (LOX)-encoding gene was chosen regarding its early and high responsiveness to several elicitors in wheat tissues and, more specifically, its involvement in defense reactions against *Bgt* (Görlach *et al.*, 1996). However, in non-infectious context, no modifications of *LOX* expression and *LOX* activity were observed in leaves of M wheat plants compared to NM plants after 6 weeks of culture. Likewise, Waller *et al.* (2005; 2008) and Stein *et al.* (2008) revealed that no induction of JA marker genes in leaf tissues of M plants (wheat or Arabidopsis) was observed in the absence of a pathogen challenge. Besides, when challenging with *Bgt*, no up-regulation of selected genes (*PAL*, *LOX*, *POX*, *CHH* or *NPR1*) expression in leaves of M plants was observed. Moreover, a repression of the *POX* and *NPR1* expression in M plants leaves infected by *Bgt* was found, whereas gene expressions were induced in NM plant leaves during the first 24 hai. Additionally, no modification of *POX* and *LOX* activities were observed in M plants infected with *Bgt*. In contrast, Nair *et al.* (2015), found a higher *LOX* activity correlated with four-fold higher Methyl Jasmonate (MeJA) content in tomato leaves of M plants compared to controls, suggesting that the systemic induction in *LOX* pathway in response to mycorrhizal colonisation plays an important role in expression of MIR against *A. alternata*. No priming effect on gene expression and on total enzymatic activity in leaves was then observed upon *Bgt* infection in M plants in our conditions. Similarly to our results, Shaul *et al.* (1999) observed a lower accumulation of targeted PR-protein in tobacco leaves of M plant in comparison to the control plant. Nevertheless, they also described a higher incidence and severity of necrotic lesions caused by *B. cinerea*, whereas we observed an effective protection of wheat leaves of M plant against *Bgt*. These results may indicate that the targeted genes and enzymatic activities do not act as effective defense of wheat leaves against *Bgt* in the M plants. One could hypothesized that other defense genes, not studied here, are induced by M inoculation and involved in the resistance of wheat against *Bgt*.

In conclusion, this current study shows for the first time that a protection against the biotrophic and above-ground fungus *Bgt* was obtained by the AMF *Fm*. This protective effect was associated with stronger local accumulations of polyphenolic compounds and H₂O₂ at *Bgt* penetration sites in epidermal cells of M wheat plant leaves during the first 48h after infection. MIR is suggested to impair *Bgt* infectious process through these cytological phenomena.

Moreover, the corresponding MIR-associated mechanisms are not related to a priming effect of the genes monitored here, although their systemic elicitation by AMF in aerial tissues was established before infection occurred. However, a global study, through transcriptomic analysis, may be an adapted tool to understand the primed state that should lead to protection against *Bgt*. A special attention might be given to determine what are the signals responsible for the systemic protection obtained in the aerial parts of the M plants. Finally, various biological parameters, such as colonization rate level or AMF species, may impact the protective efficiency conferred by mycorrhization, and need to be investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Higher Education in Syria mediated by Aleppo University.

References:

- Adhikari TK, Balaji B, Breeden J, Goodwin SB. 2007.** Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**: 55–68.
- Ahn IP, Kim S, Lee YH, Suh SC. 2007.** Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 838–848.
- Aist JR, Gold RE, Bayles CJ, Morrison GH, Chandra S, Israel HW. 1988.** Evidence that molecular components of papillae may be involved in ml-o resistance to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **33**: 17–32.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA. 2009.** Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* **60**: 377–390
- Avdiushko SA, Ye XS, Hildebrand DF, Kuc J. 1993.** Induction of lipoxygenase activity in immunized cucumber plants. *Physiological Molecular Plant Pathology* **42**: 83–95.
- Azcon R, Ocampo JA 1981.** Factors affecting the vesicular arbuscular infestation and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytologist* **87**: 677–685.
- Bagyaraj DJ, Manjunath A, Reddy DDR. 1979.** Interaction of vesicular arbuscular mycorrhizas in some tropical aquatic plants. *Transactions of the British Mycological Society* **72**:164–167.
- Briceño-Felix G, Huerta-Espino J, Torres i Ruiz L, Betbese JA, Martín Sánchez JA. 2008.** Yield losses caused by powdery mildew on bread wheat cultivars under irrigated Mediterranean conditions in Spain.

In: Molina-Cano JL, Christou P, Graner A, Hammer K, Jouve N, Keller B, Lasa JM, Powell W, Royo C, Shewry P, Stanca AM, eds. *Cereal science and technology for feeding ten billion people: genomics era and beyond*. Zaragoza, Spain: CIHEAM / IRTA, 183–185.

Bucking H, Shachar-Hill Y. 2005. Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* **165**: 899–912.

Campagnac E, Lounès-Hadj Sahraoui A, Debiante D, Fontaine J, Laruelle F, Garçon G, Verdin A, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A. 2010. Arbuscular mycorrhiza partially protect chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* **20**: 167–178

Campos-Soriano, García-Martínez J, San Segundo B. 2012. The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defense-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular Plant Pathology* **10**: 1364–3703.

Carver TLW, Robbins MP, Zeyen RJ. 1991. Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host cell responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**: 269–287.

Chandanie WA, Kubota M, Hyakumachi M. 2006. Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. *Plant and Soil* **286**: 209–217.

Chatzistathis T, Orfanoudakis M, Alifragis D, Therios. I. 2013. Colonization of Greek olive cultivars' root system by arbuscular mycorrhiza fungus. *Scientia Agricola* **70**: 185–194.

Choi HW, Lee DH, Hwang BK. 2009. The pepper calmodulin gene CaCaM1 is involved in reactive oxygen species and nitric oxide generation required for cell death and the defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1389–1400.

Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1017–1028.

Daei G, Ardekani MR, Rejali F, Teimuri S, Miransari M. 2009. Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Journal of Plant Physiology* **166**: 617–625.

Debiante D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2009. Mycorrhizal alleviates benzo[a]pyrene induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* **70**: 1421–1427.

Dugassa GD, Von Alten H, Schönbeck F 1996. Effect of arbuscular mycorrhiza on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogen. *Plant and Soil* **185**: 173–182.

Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM, Ton J. 2014. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science* **18**: 539–545.

Fiorilli V, Catoni M, Francia D, Cardinale F, Lanfranco L. 2011. The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* **93**: 237–242.

Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjaer MF, Thordal-Christensen H, Pons-Kuehnemann J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* **16**: 413–419.

Gallou A, Mosquera HPL, Cranenbrouck S, Suárez JP, Declerck S. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **76**: 20–26.

Gernns H, von Alten H, Poehling HM. 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? *Mycorrhiza* **11**: 237–243.

- Görg R, Hollricher K, Schulze-Lefert P. 1993.** Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *The Plant Journal* **3**: 857–866.
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, et al. 1996.** Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* **8**: 629–643.
- Hammer EC, Pallon J, Wallander H, Olsson PA. 2011.** Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. *FEMS Microbiology Ecology* **76**: 236–244.
- Hayek S, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Franken P. 2014.** Elucidating mechanisms of mycorrhiza-induced resistance against *Thielaviopsis basicola* via targeted transcript analysis of *Petunia* hybrid genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **88**: 67–76.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. 2007.** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* **68**: 139–146.
- Hoagland DR, Arnon DI 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station, Circular* **347**.
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K. 1999.** Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* **119**: 1251–1260.
- Joner EJ, Leyval C. 2001.** Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* **10**: 155–159.
- Jung SC, García-Andrade J, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Pozo MJ. 2009.** Arbuscular mycorrhiza confers systemic resistance against *Botrytis cinerea* in tomato through priming of JA-dependent defense responses. In: Mauch-Mani B, Schmidt A, eds, *Induced resistance: chances and limits*, IOBC/wprs Bulletin, Working Group “Induced resistance in plants against insects and diseases.” Proceedings of the meeting at Granada (Spain) 8–16.
- Kachroo A, Robin GP. 2013.** Systemic signaling during plant defense. *Current Opinions in Plant Biology* **16**: 527–533.
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiya C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006.** Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 11086–11091.
- Kasprzewska A. 2003.** Plant chitinases—regulation and function. *Cell and Molecular Biology Letters* **8**: 809–824.
- Kothari SK, Marschner H, George E. 1990.** Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytologist* **116**: 303–311.
- Kuo CG, Haung RS. 1982.** Effect of vesicular arbuscular mycorrhizae on the growth and yield of rice stubble cultured soybeans. *Plant and Soil* **64**: 325.
- Larsen J, Yohalem D. 2004.** Interactions between mycorrhiza and powdery mildew of cucumber. *Mycological Progress* **3**: 123–128.
- Le Souder C, Mazieres C, Rodes V. 1998.** La fertilisation minérale sur le blé: des pratiques régionales diversifiées. *Agreste – Les Cahiers* **30**: 31–38
- Lee SC, Hwang BK. 2005.** Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta* **221**: 790–800.

- Lee CS, Lee YJ, Jeun YC. 2005.** Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathology Journal* **21**: 237–243.
- Li AL, Wang ML, Zhou RH, Kong XY, Huo NX, Wang WS, Jia JZ. 2005.** Comparative analysis of early H₂O₂ accumulation in compatible and incompatible wheat powdery mildew interactions. *Plant Pathology* **54**: 308–316.
- Li Y, Liu Z, Hou H, Lei H, Zhu X, Li X, He X, Tian C. 2013.** Arbuscular mycorrhizal fungi-enhance resistance against *Phytophthora sojae* infection on soybean leaves is mediated by a network involving hydrogen peroxide, jasmonic acid, and the metabolism of carbon and nitrogen. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 3465–3475.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. 2007.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* **50**: 529–544.
- Lowry OH, Rosebroughi NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265–275.
- Maffei G, Miozzi L, Fiorilli V, Novero M, Lanfranco L, Accotto GP. 2014.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis attenuates symptom severity and reduces virus concentration in tomato infected by *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). *Mycorrhiza* **24**: 179–186.
- Mcgonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. 1990.** A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **115**: 495–501.
- Miozzi L, Catoni M, Fiorilli V, Mullineaux PM, Accotto GP, Lanfranco L. 2011.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis limits foliar transcriptional responses to viral infection and favors long-term virus accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 1562–1572.
- Miransari M. 2010.** Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology* **12**: 563–569
- Mitchell HJ, Hall J, Barber MS. 1994.** Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Plant Physiology* **104**: 551–556.
- Nair A, Kolet SP, Thulasiram HV, Bhargava S. 2015.** Systemic jasmonic acid modulation in mycorrhizal tomato plants and its role in induced resistance against *Alternaria alternate*. *Plant Biology* **17**: 625–631.
- Oruc HH. 2010.** Fungicides and their effects on animals. Pages 349–362. In: Carisse O, eds. *Fungicides. Agricultural and Biological Sciences* 541 pp.
- Owusu-Bennoah E, Mosse B. 1979.** Plants growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza XI. Field inoculation responses in barley, lucerne and onion. *New Phytologist* **83**: 671
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M. 1994.** Phenylalanine ammonia lyase in tobacco. (Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor). *Plant Physiology* **106**: 877–886.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158–161.
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, VanWees SCM, Bakker PAHM. 2014.** Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology* **52**:347–375.
- Polle A, Otter T, Seifert F. 1994.** Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology* **106**: 53–60.

- Pozo MJ, Jung SC, Martínez-Medina A, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C, Barea JM. 2013.** Root allies: Arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with biotic stresses. In: Aroca R. eds. *Progress in symbiotic endophytes*, Springer 289–307.
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C. 2007.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393–398.
- Pozo MJ, Verhage A, García-Andrade J, García JM, Azcón-Aguilar C. 2009.** Priming plant defense against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In: C. Azcón-Aguilar *et al.*, eds. *Mycorrhizas – Functional Processes and Ecological Impact*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 123–135.
- Randoux B, Renard D, Mulard G, Rossard S, Duyme F, Sanssené J, Courtois J, Durand R, Reignault P. 2010.** Acetylated and non-acetylated oligogalacturonides elicit different defence responses and induce resistance in wheat against powdery mildew. *Phytopathology* **100**: 1352–1363.
- Randoux B, Renard D, Nowak E, Sanssené J, Courtois J, Durand R, Reignault P. 2006.** Inhibition of *Blumeriagraminis* f. sp. *tritici* germination and partial enhancement of wheat defenses by Milsana. *Phytopathology* **96**:1278–1286.
- Rizvi R, Iqbal J, Mahmood I, Ali Ansari R. 2015.** Comparative efficacy of different arbuscular-mycorrhizal fungal spp. (AMF) on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Science & Technology* **1**: 13–26.
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R. 2006.** Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytologist* **171**: 693–698.
- Ryals J, Uknes S, Ward E. 1994.** Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* **104**: 1109–1112.
- Schüßler A, Walker C. 2010.** The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. In: Libraries at Royal Botanic Garden Edinburgh, Kew, Botanische Staatssammlung Munich and Oregon State University, Gloucester, UK, 56 p.
- Shaul O, Galili S, Volpin A, Ginzberg I, Elad Y, Chet I, Lapulnik Y. 1999.** Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**: 1000–1007.
- Singh S, Kajal Srivastava JC, Badola, Sharma AK. 2012.** Aeroponic production of AMF inoculum and its application for sustainable agriculture. *Wudpecker Journal of Agricultural Research* **1**: 186–190.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press.
- Smith SE, Facelli E, Pope S, Smith FA. 2010.** Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of Arbuscular Mycorrhizas. *Plant and Soil* **326**:3–20.
- Song F, Song G, Dong A, Kong X. 2011.** Regulatory mechanisms of host plant defense responses to arbuscular mycorrhiza. *Acta Ecologica Sinica* **31**: 322-327.
- Stein E, Molitor A, Kogel K-H, Waller F. 2008.** Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiology* **49**: 1747–1751.
- Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P. 2006.** Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* **107**: 24–253
- Tayeh C. 2012.** Induction de résistances chez le blé (*Triticum aestivum* L.) lors d’une interaction compatible avec *Blumeria graminis* (CD. E.O Speer): mécanismes mis en jeu après applications de tréhalose et d’heptanoyl

d'acide salicylique, dérivé fonctionnalisé de l'acide salicylique. PhD thesis, Université du Littoral Côte d'Opale, Calais, France.

Tayeh C, Randoux B, Vincent D, Bourdon N, Reignault P. 2014. Exogenous trehalose induces defenses in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology* **104**: 293–305.

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**: 1187–1194.

Todd JF, Paliyath G, Thompson JE. 1990. Characteristics of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiology* **94**: 1225–1232.

Troch V, Audenaert K, Vanheule A, Bekaert B, Höfte M, Haesaert G. 2014. The importance of non-penetrated papillae formation in the resistance response of triticale to powdery mildew (*Blumeria graminis*). *Plant Pathology* **63**: 129–139.

van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162

Voigt CA. 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science* **5**:168. doi: 10.3389/fpls.2014.0016

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein Det al. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 13386–13391.

Waller F, Mukherjee K, Deshmukh SD, Achatz B, Sharma M, Schäfer P, Kogel K-H. 2008. Local and systemic modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species. *Journal of Plant Physiology* **165**: 60-70.

Whipps JM. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1198–1227.

Article 2

Impact of different factors and cultivar on the protective efficacy of arbuscular mycorrhizal fungi against wheat powdery mildew

G. Mustafa, B. Tisserant, B. Randoux, J. Fontaine, A. Lounès-Hadj Saharaoui, Ph. Reignault

Soumis dans Mycorrhiza

Présentation de l'article 2

Problématique – Objectif

Dans la première partie de cette thèse, nous avons pu obtenir une protection significative du blé contre le champignon foliaire biotrophe *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) – suite à l'inoculation par le CMA *Fm*. Dans cette seconde partie, nous nous sommes intéressés à la façon dont nous pouvions optimiser cette efficacité de protection, en identifiant par exemple différents paramètres susceptibles d'influencer le taux de mycorhization du blé et/ou le biocontrôle de la maladie par la mycorhization du blé.

Très peu de paramètres pouvant influencer le niveau de protection des plantes mycorhizées ont été étudiés dans le cadre d'une résistance induite des plantes contre des pathogènes fongiques. Quelques travaux ont montré l'influence de différentes espèces mycorhiziennes à induire une protection contre des agents pathogènes racinaires (Pozo *et al.*, 2002; Castellanos-Morales *et al.*, 2012). En revanche, aucune étude ne décrit l'utilisation des CMA pour protéger le blé. En parallèle d'un travail sur différents inocula mycorhiziens, qui pourraient posséder différentes efficacités pour induire une résistance, nous nous sommes également intéressés à l'impact de la concentration du P sur cette protection induite. En effet, le P est connu pour influencer la mise en place de la symbiose mycorhizienne lors d'une interaction entre une plante et un CMA (Ratnayake *et al.*, 1978; Grant *et al.*, 2004). Qu'en est-il de la protection qui pourrait en découler ? Enfin, nous nous sommes interrogés sur l'influence du niveau de résistance du cultivar de la plante lors de ses interactions avec le CMA et le parasite.

Nous avons donc étudié l'impact de 3 facteurs différents sur la protection du blé contre *Bgt* en réponse à l'inoculation mycorhizienne:

1. la concentration de phosphore (P, P/5 et P/10 avec P correspondant à 62 mg l⁻¹ ou 73 kg ha⁻¹, la dose moyenne utilisé au champ en France pour la culture du blé (Le Souder *et al.*, 1998).

2. le type d'inoculum mycorhizien; l'inoculum *Ri*, produit au laboratoire à base d'une espèce de CMA *Rhizophagus irregularis*, et deux autres commerciaux, Solrize® SZE à base de *Glomus* sp. et *Fm* à base de *Funneliformis mosseae* ont été comparés.

3. le cultivar de blé, Orvantis et Lord, possédant des niveaux de résistance de 5 et 7 respectivement (modérément sensible et résistant à *Bgt*).

Les impacts de ces différents facteurs ont été évalués sur différents paramètres : (i) les taux d'infection par *Bgt* des feuilles de blé, (ii) les taux de mycorhization par les CMA des racines des plants de blé, (iii) la croissance du blé (taille, nombre de feuilles et de tiges, biomasses sèches aérienne et racinaire) et (iv) la réponse du blé à l'infection par *Bgt* par des études cytologiques (processus d'infection de *Bgt* et réactions de la plante par le suivi de la formation de papilles fluorescentes aux sites de pénétration)

Résumé des principaux résultats

Nos résultats ont montré que l'efficacité de la protection du blé contre l'oïdium en utilisant l'inoculation mycorhizienne par les CMA comme moyen de lutte alternative peut être influencée par la concentration de P, le type d'inoculum mycorhizien utilisé et le niveau de résistance du cultivar de blé. Une réduction par 5 de la dose de P apportée par rapport à celle du champ améliore le taux de mycorhization des racines des plants de blé par *Fm* et favorise sa protection contre l'oïdium. En revanche, une trop forte diminution en P affecte la croissance de la plante, baisse de croissance qui ne sera pas compensée par l'ajout d'un inoculum mycorhizien.

Parmi les 3 inocula testés à P/5, les meilleurs taux de mycorhization ont été observés avec *Fm* (38%), suivi de *Ri* (19%) et SZE (8%). Les meilleurs taux de protection contre *Bgt* ont été obtenus avec l'inoculum *Fm* (74%) et SZE (58%), suivis de *Ri* (34%). Ainsi au regard des résultats obtenus pour *Ri* et SZE, nous pouvons suggérer qu'un taux de mycorhization élevé n'est pas forcément nécessaire pour obtenir un bon taux de protection. De plus, nos données précédentes mettent en évidence que cette résistance induite par la mycorhization ou MIR (Mycorrhiza-Induced Resistance) est associée à une réduction du nombre d'haustoria et à une accumulation de composés polyphénoliques au site d'infection de *Bgt*. Enfin, il est important de noter, que quelque soit le niveau de sensibilité du cultivar testé, nous avons toujours obtenu un gain de protection contre *Bgt* chez les blés mycorhizés par comparaison aux blés non mycorhizés. En fonction du niveau de résistance du cultivar utilisé (Orvantis ou Lord, respectivement modérément sensible et résistant), l'accumulation de composés phénoliques peut se faire soit dans l'ensemble de la cellule épidermique de feuille (chez le plus résistant), soit au niveau des papilles et/ou dans l'ensemble de la cellule (chez le plus sensible). L'ensemble de nos résultats souligne l'importance de la prise en compte de ces différents paramètres, autant pour optimiser l'efficacité de la protection du blé contre l'oïdium en réponse aux CMA, que pour étendre l'utilisation de ces traitements à différents cultivars sensibles ou modérément sensibles à la maladie.

Impact of different factors on the protective efficacy of arbuscular mycorrhizal fungi against wheat powdery mildew

G. Mustafa, B. Randoux, B. Tisserant, J. Fontaine, M. Magnin-Robert, A. Lounès-Hadj Sahraoui*, Ph. Reignault

Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Université du Littoral Côte d'Opale, 50, rue Ferdinand Buisson, F-62228 Calais cedex, France.

Abstract:

A potential alternative strategy to chemical control of plant diseases could be the stimulation of plant defense by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Mycorrhization has been previously demonstrated to protect wheat against *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), responsible for powdery mildew. We investigated here parameters influencing AMF protective efficiency and demonstrated that it varied with phosphorus (P) concentration, AMF inoculum type and wheat cultivar resistance level against *Bgt* in controlled conditions.

A 5-fold reduction of the P dose (P/5) both improved wheat mycorrhization and promoted protection against *Bgt*. However, a further decrease affected plant growth, even in mycorrhizal conditions.

At P/5, three mycorrhizal inocula were tested, and the highest mycorrhizal (M) rate was observed with *Funneliformis mosseae* (*Fm*, 38 %), followed by *Rhizophagus irregularis* (*Ri*, 19%) and SZE® (8%). On the other hand, the highest protection rates against *Bgt* were obtained with *Fm* (74%) and SZE (58%) followed by *Ri* (34%), suggesting that M rate does not necessarily determine the protection level of wheat against *Bgt* but rather the inoculum type.

This mycorrhiza-induced resistance (MIR) has been associated with a reduction in the number of conidia with haustorium and with an accumulation of polyphenolic compounds at *Bgt* infection sites. Depending on the cultivar resistance level, this accumulation appears either at the whole cell (in the most resistant), or both the papilla and/or whole cell (in the most sensitive) levels. Our study emphasizes the importance of taking account of the considered parameters to optimize the use of AMF as biocontrol agents.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, powdery mildew, wheat, phosphorus, mycorrhiza-induced resistance, biocontrol.

Introduction

Wheat powdery mildew, caused by the obligate parasitic ascomycete *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, (*Bgt*) is one of the most damaging diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.), especially in Northern Europe. It is responsible for yield losses that would be even more important without a successful control that relies mainly on fungicides. Indeed, fungicides are routinely

applied to control fungal diseases of wheat and other cereal crops. Considering the emergence of fungicides-resistant pathogens strains (Vargas, 1973, Buchenauer and Hellwald, 1985, Heaney et al. 2000) and the negative impact of fungicides on both human health and environment, there is an increasing trend towards research and development of complementing and/or alternative methods to chemical control (Oruc 2010; Kumar et al. 2013). One of potential alternative strategy is to stimulate the natural plant defense by using arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). AMF are microscopic soil borne Glomeromycota fungi, establishing symbioses with over 80% of higher plant species including many important crops species (Smith and Read 2008). The host plant provides the fungus with photosynthates while the fungus improves water and mineral nutritions of the plant. For example, it was demonstrated that root mycorrhizal colonization can lead to increase phosphorus (P) uptake by ten times compared to root hairs only (Sanders and Tinker 1973; Gilbert 2009; Cozzolino et al. 2010; Li et al. 2014). AMF can obtain free P from the soil using high-affinity P transporters expressed in the mycelium (Harrison and van Buuren 1995). Once taken up by the extraradical mycelium, P is translocated along the hyphae in the form of polyphosphates, which are then depolymerized so that P can be transferred to root cells in exchange for hexoses (Ohtomo and Saito 2005). This last step involves both plant and fungal transporters located at the periphery of arbuscules (Bapaume and Reinhardt 2012). Subsequently, the inoculation with AMF of some plants improves growth performance (Temperini et al. 2009, Nair et al. 2015).

Moreover, AMF play also a crucial role in enhancing plant resistance to both biotic and abiotic stresses (Gianinazzi et al. 2010). Several studies reported the beneficial effect of AMF as bioprotective agents against root and foliar diseases (Pozo et al. 2013). One of the first mechanisms proposed to explain the mechanisms involved in mycorrhizal-induced protection was the improvement of plant nutrition and compensation of the damages caused by the pathogen through increasing plant growth (Fritz et al. 2006). However, the protective effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis cannot be regarded as just consequence of improved nutrition (Trotta et al. 1996; Fritz et al. 2006; Liu et al. 2007). AMF can suppress plant diseases through induction of systemic resistance known as MIR (Mycorrhizal-Induced Resistance) (Pineda et al. 2010; Jung et al. 2012). Several works observed that systemic induced resistance mechanisms implied in M plant protection. The use of experimental split-root systems has confirmed that the protection by AMF is manifested in non-colonized areas of the M root system, resulted in an elicitation of tomato root wall thickenings containing (non-esterified pectins) and PR-1a protein production, increased the hydrolytic and

antioxidant enzyme activities like chitinase, chitosanase, β -1,3-glucanase and superoxide dismutase in response to penetration attempt of *Phytophthora parasitica* (Cordier et al. 1998; Pozo et al. 1999, 2002). Moreover, MIR was appeared by an increased phenol content in roots infected by *Ralstonia solanacearum* or up-regulated of defence genes expression such as *CHI1b*, *PR10*, glutathione S-transferase in grapevine against the nematode (Zhu and Yao 2004; Hao et al. 2012). Likewise, MIR was observed against foliar pathogens. It was found that the AMF contributed to the resistance of soybean against *Phytophthora sojae* by the release of hydrogen peroxide (H_2O_2) and the accumulation of jasmonic acid (Li et al. 2013). Furthermore, an eliciting effect of M inoculation was observed on leaf tissues under non-infectious conditions, via a stimulation of PR-proteins gene expression in several pathosystems, alfalfa/*Xanthomonas* Rice/*Magnaporthe oryzae* (Campos-Soriano et al. 2012).

Very few studies focused on the factors which could influence arbuscular mycorrhizal protective effect against plant diseases *campestris* (Liu et al. 2007), potato/*Phytophthora infestans* (Gallou et al. 2011) and

. One of these influencing parameters could be the AMF species (Khaosaad et al. 2007; Rouphe el et al. 2010). Indeed, it was showed that the AMF *Funneliformis mosseae* species was more efficient than *Rhizophagus irregularis* to protect tomato against *Phytophthora parasitica* (Pozo et al. 2002) and rice against the nematode *Meloidogyne graminicola* (Shrinkhala 2011). Fernández et al. (2014) tested the ability of both AMF to colonize three host plant species, tomato, soybean and maize. Mycorrhizal colonization levels obtained with *R. irregularis* were higher than those obtained with *F. mosseae* for the three plant species, suggesting that *R. irregularis* was a more effective root colonizer than *F. mosseae* in these plants (Fernández et al. 2014).

Another factor which could impact plant protection by mycorrhizal inoculation is the cultivar resistance level (Grandison et al. 1986; Wanlei et al. 2009; Steinkellner et al. 2011). Grandison et al. (1986) showed that mycorrhizal protection against *Meloidogyne hapla* infection in alfalfa was found to be higher in the roots of the resistant cultivar than in the susceptible one.

Even if few authors addressed the factors influencing arbuscular mycorrhizal protection against plant disease, this query is not well documented. After describing the protection in mycorrhizal wheat against *Bgt* (Mustafa et al. 2014), the present work aims to study the impact of different factors, in particular different P concentrations, AMF inoculum type

(*Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis mosseae* and SZE®) and wheat cultivar resistance level against *Bgt* infection (moderately susceptible or resistant) on wheat protection. Microscopic observation of *Bgt* conidia development was performed 48 hours after infection, and polyphenolic compound accumulation was estimated in leaves at the penetration site of *Bgt*. In parallel, the impact of these factors on root mycorrhizal rate and wheat growth were evaluated and their links with the protection are discussed.

Materials and methods

I. Plant material and AM fungal inoculation

Two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars, Orvantis and Lord (Benoist C.C., Orgerus, France), showed resistance notes of 5 and 7, respectively, on a scale from 1 (fully susceptible) to 9 (fully resistant) at the field level against *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), the causal agent of wheat powdery mildew, were used in this study. Seeds were pre-germinated and transplanted into pots filled with an autoclaved substrate consisting of sand, perlite and vermiculite (2:1:1) sterilized twice (120°C and 1 bar for 30min). Three types of inoculum were used:

1. *Rhizophagus irregularis* (*Ri*) DAOM 197198. It had been propagated on *Trifolium repens* L and produced in our laboratory (UCEIV, France).
2. *Funneliformis mosseae* (*Fm*) (MycAgro Ltd, France).
3. SOLRIZE® (SZE), consisting of a mix of *Glomus* sp. (Agrauxin Ltd, France).

For all treatments, whatever the inoculum type, each pot (capacity: 300 ml) was supplemented with 30 g of an inoculum consisting of substrate, AMF spores and chopped fresh colonized roots. Non-Mycorrhizal plants (NM) were supplemented with the equivalent amount of autoclaved inoculum, in order to provide plants with the same organic substances as Mycorrhizal (M) plants. The mycorrhizal and sterilized inoculum were placed 3 cm below the wheat seeds at sowing time. Seedling were incubated in controlled growth chamber at 12-18°C night/day, a 12h-12h photoperiod and 70% humidity. Plants were irrigated with 50 ml pot⁻¹week⁻¹ of a Hoagland's solution (Hoagland & Arnon, 1950) and with distilled water as necessary. Three phosphorus concentrations (P, P/5 and P/10) were used, with P representing the average dose of phosphorus applied in wheat field in France (P = 62 mg l⁻¹ corresponding to approximately 73 kg ha⁻¹ of phosphorus (Le Souder et al. 1998).

II. Pathogen Infection

The *Bgt* MPEbgt1 isolate used in this study was kindly provided by Dr M.-P. Latorse from Bayer Crop Science (Lyon, France). The fungus was maintained on wheat plants in a separate room culture until heavily sporulation. The leaves of 6 weeks-old plants were sprayed with 10 days-old *Bgt* conidia that were collected by vacuum extraction from fully sporulating leaves and suspended in FC43 (heptacosafuorotributhylamine, Fluorinert™ Electronic Liquid, 3M, Cergy-Pontoise, France). The conidia suspension concentration was adjusted at $5 \cdot 10^5$ spores ml^{-1} except for cytological test, for which the conidial suspensions were adjusted at $6 \cdot 10^5$ spores ml^{-1} . *Bgt* symptoms were counted 8 and 11 days after infection (dai) for Orvantis and Lord cultivar, respectively. The number of colonies leaf⁻¹ of wheat plants was counted either on all the infected leaves or the 3rd expanded leaf only.

III. Plants growth parameters measurement

After 6 weeks of culture, different parameters of plant growth were evaluated. Plant length, leaf and stem numbers were noted for each plant. Shoot and root dry biomasses were harvested and then dried in a hot air oven at 60°C for 48 h until constant weight. Three distinct pots were used as biological replicates for each treatment, considering every pot as a single sample (5 plants pot^{-1}).

IV. Estimation of mycorrhizal rate

All events related to AMF root colonization, namely internal hyphae, arbuscules and vesicles were visualized after 6 weeks of culture by microscopic observation on Trypan blue-stained roots. Wheat plant roots were washed with distilled water to remove the small amount of strongly adhering sand. They were cleared in KOH 10% solution (v/v) for 1 hour at 70°C, then stained with Trypan blue (0.5 g l^{-1}) in a water, glycerol and lactic acid mixture (1:1:1, v/ v/ v) for 1 hour at 70 °C (Phillips and Hayman 1970). The root fragments were stored in a water/glycerol/lactic acid (1:1:1, v/v/v) solution. Root colonization rate was calculated using the grid line intersect method (McGonigle et al. 1990). One hundred root fragments from 15 plants sampled from three different pots (5 plants pot^{-1}) were observed under an optical microscope (x100 magnification). Three intersections per root fragment were examined. In total, 300 observations per treatment were analyzed. The total mycorrhization rate (containing arbuscules, vesicles and hyphae) was estimated.

V. Cytological observation of *Bgt* conidia development and localized auto-fluorescence associated with papillae formation

After 6 weeks of culture, the 3rd leaf of NM and M wheat plants inoculated with *Ri*, SZE and *Fm* and infected with *Bgt* was harvested 48 hour after infection (hai), cleared in an ethanol: acetic acid solution (3:1) and then stained using 0.1% (w/v) Trypan blue.

On the one hand, the different developmental stages of *Bgt* were monitored: (i) conidium with a primary germ tube only (PGT), (ii) abortive appressorial germ tube (Abortive AGT), and AGT (iii) without and (iv) with a haustorium (HS). Conidia with HS formation and branched hyphae were also observed 72 hai. Percentages of each event were scored.

On the other hand, the percentages of Fluorescent Papilla (FP) and whole fluorescent cells in response to penetration by AGTs were estimated. FP = number of auto-fluorescent papillae x 100/number of appressoria (Yokoyamai et al. 1991); whole fluorescent cells = number of whole fluorescence cells x 100/ number of appressoria. When necessary, fluorescence intensity of papillae was classified on a 0–2 scale modified from Carver et al. (1991): class 0 (no visible fluorescent papilla); class 1 (weakly fluorescent papilla) and class 2 (strongly fluorescent papilla) (Randoux et al. 2006). All events were observed using an Eclipse E600 (Nikon, Corporation Japon, Tokyo) (excitation EX450-490 nm, DM505, BA520 nm transmittance range, x1000 or x400).

VI. Statistical Analysis

Overall, three distinct pots – each one contains 5 plants – were used as biological replicates for each treatment. Data were analyzed statistically by mean comparison by the least significant difference (LSD) test using Statgraphics release 5.1 software (Manugistic, 278 Inc., Rockville, MD, USA). Standard deviations were calculated by Microsoft Office Excel 2007 for all the data in this paper. Percentages were converted to arcsin values before the analysis of ANOVA and LSD test.

Results:

1. Impact of phosphorus concentrations

a. On wheat root colonization rate by Fm

Results presented in Table I showed that the use of P/5 and P/10 concentrations during plant culture resulted in significant increases of the total root mycorrhizal rates compared to

the P concentration, 2.3- and 3-fold respectively. No mycorrhizal structures were detected in the roots of plants grown in the presence of autoclaved inoculum (data not shown).

Table I: Impact of phosphorus concentrations on total root colonization rate of Orvantis wheat cultivar inoculated with *Fm* after 6 weeks of culture. Plants were irrigated with Hoagland's solution. [P] = 62 mg l⁻¹. Different letters indicate significant differences between total root mycorrhizal rates at different phosphorus concentrations according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Observations were carried out on 100 root fragments. Mean values were obtained from three independent experiments and each one corresponds to 15 plants sampled from three different pots.

	Phosphorus concentrations		
	P	P/5	P/10
Total root mycorrhizal rate (%)	16.6 a	38.4 b	47 c

b. On the growth of M and NM plants

After 6 weeks of culture, the impact of phosphorus concentration on wheat development in *Fm* M and NM plants was evaluated by measuring various plant growth parameters (Table II).

In NM plants, while leaf and stem numbers were 1.5- and 2.5- fold lower, respectively, at the lowest P/10 concentration compared to the highest P concentration, no significant difference was recorded for either root or shoot dry weight between these concentrations. On the contrary, plant length exhibited its maximum value (9% higher compared to P) at P/5. No other significant difference was observed between plant growth parameters at P/5 concentration and the highest P concentration.

In M plants, our results showed that, except for root dry weight, all wheat growth parameters were significantly reduced with P/10 concentration compared to the P one. Reductions were estimated at 12% for plant length, 51% for shoot dry weight. Likely, a reduction of leaf and stem numbers was observed and estimated to 1.5- and 3- fold respectively. Leaf and stem numbers at P/5 exhibited intermediate values between those obtained with P and P/10 concentrations, whereas other growth parameters were not significantly different at P/5 compared to P concentration.

A comparison between M and NM plant growth parameters at a given phosphorus concentration showed a significant reduction in M plant lengths estimated at 11% for the P/5 and 16% for P/10 concentrations. Conversely, root dry weight at P/10 and P/5 increased by 36 and 42% respectively. Likewise, shoot dry weight at P/5 and P increased by 20 and 55% respectively in M plants compared to NM plants.

Table II: Impact of phosphorus concentrations on Non-Mycorrhizal (NM) and *Fm* Mycorrhizal (M) wheat plant growth after 6 weeks of culture. Plants were irrigated with Hoagland’s solution. [P] = 62 mg l⁻¹. For each plant growth parameter, different letters indicate significant differences between the three phosphorus concentrations for NM or M plants. *: indicates a significant difference between NM and M plant growth parameter for a given phosphorus concentration according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Mean values resulted from 15 plants sampled from three different pots.

Phosphorus concentrations	NM			M (<i>Fm</i>)		
	P	P/5	P/10	P	P/5	P/10
Plant length (cm)	42±5 a	46± 3.43 b	44±2 ab	42±1.79 b	41±2.82 b*	37±3.76 a*
Leaf number plant ⁻¹	9± 2 b	8 ±1.60 ab	6±1.26a	10±0.94c	8±1.79 b	6.6±0.96a
Stem number plant ⁻¹	2.5±0.52 b	2±0.87 ab	1± 0.52 a	3±0.56 c	2±0.78 b	1±0.52 a
Root dry weight (mg 5 plants ⁻¹)	370±60 a	250±10 a	270±20 a	420±40 a	430±60 a*	420±20 a*
Shoot dry weight (mg 5 plants ⁻¹)	1070±120 b	1040±60 b	770±70 a	1630±420 b*	1300±60 ab*	800±40 a

c. On wheat *Bgt* infection

The impact of the three tested phosphorus concentrations P, P/5 and P/10 on *Bgt* infection rate in NM and M plants is presented in Table III. In NM plants, the use of the lowest phosphorus concentrations (P/5 and P/10) significantly reduced the number of *Bgt* colonies compared to P concentration by 30 and 33%, respectively. However, the infection level decreases were estimated at 53 and 74% in the same conditions for M plants. For a given phosphorus concentration, protection rates obtained in M plants compared to NM ones were 66, 77 and 87% for phosphorus concentrations P, P/5 and P/10, respectively.

Table III: Impact of phosphorus concentrations on Orvantis cultivar infection by *Bgt* (5.10^5 spores ml⁻¹). Infection tests were performed on 6-week-old plants and colonies were counted 8 dai. Plants were irrigated with Hoagland’s solution. [P] = 62 mg l⁻¹. Different letters indicate significant differences between results obtained with various phosphorus concentrations in Non-Mycorrhizal (NM) or Mycorrhizal (M) wheat plant leaves. *: indicates a significant difference between M and NM wheat plants, for a given phosphorus concentration, according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Mean values were obtained from three independent experiments and each one corresponds to 15 plants sampled from three different pots.

Number of colonies leaf ⁻¹	Phosphorus concentrations		
	P	P/5	P/10
NM	81.5 ±11 b	57.2 ±10 a	54.7±12 a
M (<i>Fm</i>)	27.4 ±5 b*	13 ±4 a*	7±2 a*

2. Impact of mycorrhizal inoculum type

Three distinct mycorrhizal inoculum types (*Ri*, *SZE* or *Fm*) were also tested. The impact of these inocula was determined on root colonisation rate, growth and *Bgt* infection in wheat plants after 6 weeks of culture using the P/5 concentration during irrigation.

a. On wheat root colonization

Table IV shows that the highest total M rate was obtained with the *Fm* inoculum. It was estimated at 38.4% compared to 8 and 19% obtained with SZE and *Ri*, respectively.

Table IV: Impact of mycorrhizal inoculum type (*Ri*, SZE or *Fm*) on total root colonisation rate of Orvantis wheat cultivar after 6 weeks of culture. Wheat plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, [P/5] = 12.4 mg l⁻¹. Different letters indicate significant differences between total root mycorrhizal rates obtained with *Ri*, SZE and *Fm* inocula according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Observations were carried out on 100 root fragments from 15 plants sampled from three different pots.

Mycorrhizal inoculum	Total root mycorrhizal rate (%)
<i>Ri</i>	19 b
SZE	8 a
<i>Fm</i>	38.4 c

b. On plant growth

The impact of mycorrhizal inoculum types on wheat growth are presented in Table V. Length of M plants inoculated with *Fm* significantly decreased by 11% compared to NM ones, whereas it decreased to a larger extent (20-24%) in M plants inoculated with *Ri* and SZE, respectively.

In addition, an increase in shoot dry weight was obtained with *Ri* inoculum; this increase ranged between 47 and 30% when compared to SZE and *Fm*, respectively, and 44% when compared to NM plants. However, all M plants showed an increase in root dry weight, by 34, 28, 42% for *Ri*, SZE and *Fm* inoculum respectively, compared to NM plants.

No significant difference was observed for the other growth parameters whatever the plant culture conditions.

Table V: Impact of mycorrhizal inoculum types on Orvantis wheat cultivar growth after 6 weeks of culture. The Non-Mycorrhizal (NM) and Mycorrhizal (M) wheat plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, [P/5] = 12.4 mg l⁻¹. For each plant growth parameter, different letters indicate significant differences between different tested conditions according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Mean values resulted from 15 plants sampled from three different pots.

	NM	M		
		<i>Ri</i>	SZE	<i>Fm</i>
Plant length (cm)	46± 3.43c	37±3 a	35±1.34 a	41±2.82 b
Leaf number plant ⁻¹	8 ±1.60 a	8±2 a	7±1.22 a	8±1.79 a
Stem number plant ⁻¹	2±0.87 a	2±0.82 a	2±0.57 a	2±0.78 a
Root dry weight (mg 5 plants ⁻¹)	250±10 a	380±90 b	320±80 b	430±60 b
Shoot dry weight (mg 5 plants ⁻¹)	1040±60 a	1870±190 c	1000±20 a	1300±60 b

c. On protection against *Bgt*

Figure 1 showed that *Bgt* symptom expression on Orvantis wheat cultivar was lower on M plants compared to NM ones.

The effect of M inoculum type on *Bgt* infection is presented in table VI. M inoculations by *Ri*, SZE and *Fm* significantly reduced *Bgt* infection of this susceptible wheat cultivar. The highest protection rate was obtained with the *Fm* inoculum (74%), followed by SZE (58%) and finally *Ri* (34%), when compared to NM plants.

Table VI: Impact of mycorrhizal inoculum type on the infection of Orvantis wheat cultivar by *Bgt* (5.10^5 spores ml^{-1}). Infection tests were performed on 6-week-old wheat plants and colonies were counted 8 dai. Plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, $[\text{P}/5] = 12.4 \text{ mg l}^{-1}$. Different letters indicate significant differences between the number of colonies leaf⁻¹ obtained with *Ri*, SZE, *Fm* inocula and Non-Mycorrhizal (NM) plants according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Results were obtained from three independent experiments and each one corresponds to 15 plants sampled from three pots.

Mycorrhizal inocula		Number of colonies/ leaf
	NM	$65 \pm 26 \text{ c}$
M	<i>Ri</i>	$43 \pm 19 \text{ b}$
	SZE	$27 \pm 13 \text{ a}$
	<i>Fm</i>	$17 \pm 7 \text{ a}$

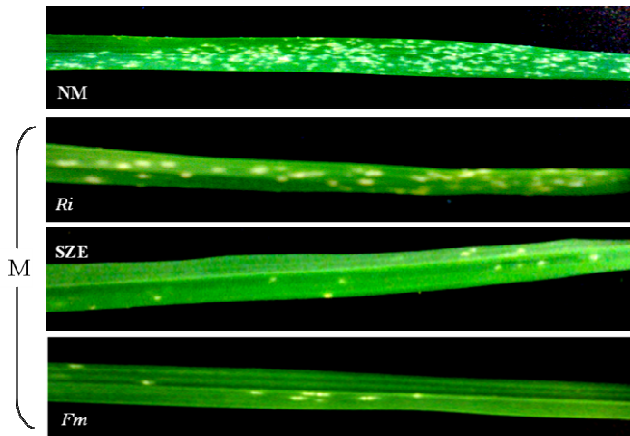


Figure 1: Leaf symptoms expressed 8 dai on Orvantis wheat cultivar infected by *Bgt* (5.10^5 spores ml^{-1}). Plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, $[\text{P}/5] = 12.4 \text{ mg l}^{-1}$. NM: Non-Mycorrhizal and M: Mycorrhizal plants with *Ri*, SZE or *Fm* as an inoculum.

d. On *Bgt* infection process

The impact of arbuscular mycorrhizal inoculation on *Bgt* infection process was studied via the assessment of different *Bgt* developmental stages [(conidia with primary germ tube (PGT) only, abortive appressorial germ tube (abortive AGT), AGT without and with haustorium (HS)], which were observed under the microscope 48 hai (Figure 2a, b, c and d). The presence of AGT with HS and branched hyphae was also monitored 72 hai (Figure 2e) on M (*Ri*, SZE and *Fm*) and NM wheat epidermal leaf cells (Table VII).

Whereas SZE or *Ri* inoculation resulted in less frequent conidia with PGT only on M wheat leaves compared to NM ones (3.6- and 8.3-fold respectively), no significant difference between *Fm* and NM plants was observed (Table VII). In addition, abortive AGT on *Fm* M plants increased 10-fold in comparison with NM ones and 8- and 5-fold, respectively, compared to other M plants inoculated with SZE and *Ri*.

Moreover, *Bgt* haustorium development in leaf epidermal cells of *Fm* or SZE M plants was reduced at least 2-fold compared to NM plants. Conversely, this parameter increased 1.3-fold in *Ri* M plants compared to NM ones.

Additionally, percentage of AGT with HS and branched hyphae observed 72 hai was reduced in *Ri*, *Fm* and SZE M plants 1.7, 5- and 17-fold, respectively, compared to NM ones.

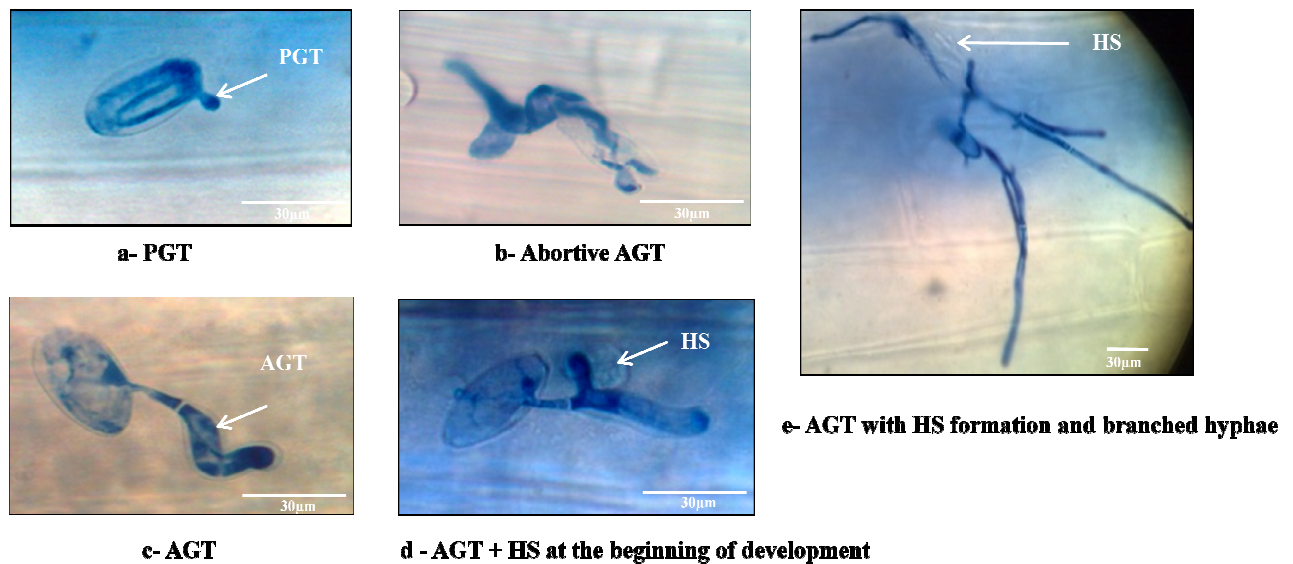


Figure 2: Microscopic observation of different stages of *Bgt* development (infection with 6.10^5 spores ml^{-1}) in epidermal leaf cells in both Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) wheat plants. PGT: primary germ tube; AGT: appressorial germ tube; HS: haustorium. Stages a, b, c and d were observed 48 hai. Stage e was observed 72 hai. All events were observed on the 3rd leaf from 5 distinct plants.

Table VII. Percentages of the different developmental stages of *Bgt* conidia observed in epidermal leaf cells in both Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) Orvantis wheat cultivar infected by *Bgt* (6.10^5 spores ml^{-1}). Plants were irrigated with Hoagland’s solution containing phosphorus at P/5 concentration, [P/5] = 12.4 mg l^{-1} . PGT: primary germ tube; AGT: appressorial germ tube; HS: haustorium. All events were observed on the 3rd leaf from 5 distinct plants. Different letters indicate significant differences between the different tested conditions according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

Conidia developmental stage	Event (%)				
	NM	M			
		<i>Ri</i>	SZE	<i>Fm</i>	
48hai {	PGT only	9.28 b	1.12 a	2.56 a	8.62 b
	Abortive AGT	1 a	2.25 a	1.28 a	10.34 b
	AGT without HS	41.23 b	31.46 a	72 d	57.76 c
	AGT with HS	48.45 b	65.17 c	24 a	23.27 a
72hai {	AGT with HS formation and branched hyphae	40 d	24 c	2.4 a	8 b

e. On auto-fluorescence associated with polyphenolic compounds accumulation in wheat epidermal leaf cells

Using fluorescence microscopy, auto-fluorescence associated with polyphenolic compounds accumulation resulting from infection events was observed at the cellular level.

The percentages of fluorescent papillae (FP) and whole-fluorescent epidermal cells (Figure 3 A and B) were estimated (Table VIII). Whatever the microscopic parameter, FP or whole-fluorescent cells, values obtained with *Ri*-inoculated plants showed no significant difference compared to NM ones. The higher FP percentage was recorded in SZE and *Fm* M plants (54 and 85%, respectively) compared to NM plants (37.5%). Likewise, whole-fluorescent epidermal cells were more frequent in leaves of SZE and *Fm* M plants (9 and 10% respectively) compared to NM plants (1%).

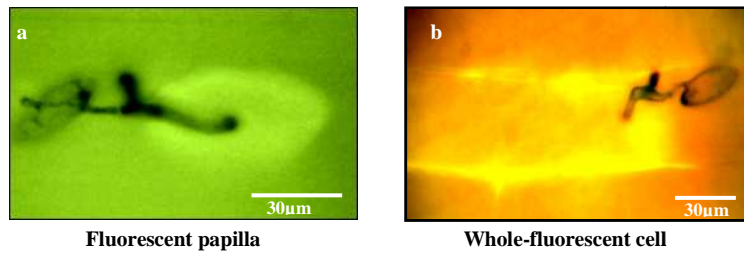


Figure 3: Localized auto-fluorescence associated with the formation of papillae (a) and whole-fluorescent cell (b) at the penetration sites of *Bgt* (6.10^5 spores ml^{-1}) in Orvantis wheat cultivar epidermal cells. Both events were observed 48 hai on the 3rd leaf from 5 distinct plants.

Table VIII. Percentages of Fluorescent Papillae (FP), and whole-fluorescent cell observed 48 hai in Non-Mycorrhizal (NM) and Mycorrhizal (M) Orvantis wheat cultivar by *Ri*, SZE or *Fm* and infected by *Bgt* (6.10^5 spores ml^{-1}). Plants were irrigated with Hoagland’s solution containing phosphorus at P/5 concentration, [P/5] = 12.4 $mg\ l^{-1}$. Observations were carried out on the 3rd leaf from 5 distinct plants. Different lettres indicate significant differences between different conditions according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

	NM	M	
		<i>Ri</i>	<i>Fm</i>
FP (%)	37.5 a	35.25 a	85 c
Whole-fluorescent cell (%)	1.13 a	3.6 a	12.76 b
		SZE	
		54 b	
		9.2 b	

3. Effect of wheat cultivar resistance level

To investigate the effect of cultivar resistance level on wheat mycorrhizal rate, growth and protective efficiency of mycorrhizal inoculation by *Fm* against *Bgt* infection, two wheat cultivars (Orvantis and Lord moderately susceptible and more resistant to *Bgt* respectively) were tested after 6 weeks of culture using the P/5 concentration during irrigation.

a. On wheat root mycorrhizal rate.

Total root mycorrhizal rates obtained with Orvantis and Lord are presented in Table IX. Corresponding values were 37.5 and 26.3% in Orvantis and Lord, respectively.

Table IX: Impact of wheat cultivar resistance level against *Bgt* on total root mycorrhizal rate by *Fm* in Orvantis (resistance level = 5) and Lord (resistance level = 7) wheat cultivars after 6 weeks of culture. Plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, [P/5] = 12.4 mg l⁻¹. *: indicates a significant difference between Orvantis and Lord mycorrhizal rates according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Results were obtained from three independent experiments. Observations were carried out on 100 root fragment from 15 plants sampled from three different pots.

	Wheat cultivar	
	Orvantis (resistance level = 5)	Lord (resistance level = 7)
Total root mycorrhizal rate (%)	37.5	26.3 *

b. On plant growth

Plant growth parameters were compared between Lord and Orvantis wheat cultivars. NM plants exhibited lower values in Lord compared to Orvantis for the average numbers of leaves and stems. However, plant length and root dry weight were similar for both cultivars.

In M plants, while, root dry weight was lower by 53% in Lord compared to Orvantis and plant length was higher by 7%. Similar results were obtained for M leaf and stem numbers and shoot dry weight compared to NM plants for both Orvantis and Lord cultivars.

Moreover, root colonization by *Fm* decreased plant lengths compared to NM ones by 11% and 8% for Orvantis and Lord cultivars, respectively.

Table X: Impact of wheat cultivar resistance level and *Fm* M inoculation on wheat growth. Plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, [P/5] = 12.4 mg l⁻¹. Different letters indicate a significant difference between Orvantis (resistance level = 5) and Lord (resistance level = 7) in Non-Mycorrhizal (NM) or Mycorrhizal (M) wheat plants. *: indicates a significant difference between (NM) and (M) plants for the same cultivar according to the LSD tests ($P \leq 0.05$). Mean values resulted from 15 plants sampled from three different pots.

	NM		M (<i>Fm</i>)	
	Orvantis (5)	Lord (7)	Orvantis (5)	Lord (7)
Plant length (cm)	46± 3.43 a	48±3.2 a	41±2.82 a *	44±2.61 b *
Leaf number plant ⁻¹	8 ±1.60 b	5±0.3 a	8±1.79 b	5±0 a
Stem number plant ⁻¹	2±0.87 b	1±0 a	2±0.78 b	1±0 a
Root dry weight (mg 5 plants ⁻¹)	250±10 a	200±100 a	430±60 b*	200±0 a
Shoot dry weight (mg 5 plants ⁻¹)	1040±60 a	800±100 a	1300±60 b*	800±100 a

c. On wheat infection by Bgt

The impact of wheat cultivar resistance level to *Bgt* in NM and *Fm* M plants on *Bgt* infection rate are presented in Table XI. The symptoms emergence on Lord wheat leaves was delayed by 3 days compared to Orvantis (data not shown). The numbers of *Bgt* colonies leaf⁻¹

in NM Lord plants were 83% lower in comparison with those in Orvantis. In addition, *Bgt* colony numbers were significantly lower (77-61%) in Orvantis and Lord wheat cultivar respectively when M plants were compared to NM ones.

Table XI: Impact of wheat cultivar resistance level and mycorrhizal inoculation by *Fm* on the infection by *Bgt* (5.10^5 spores ml^{-1}). Infection test was performed on 6-week-old wheat plants and colonies were counted 8 and 11 dai on Orvantis and Lord cultivar respectively. Plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, $[P/5] = 12.4 \text{ mg l}^{-1}$. Different letters indicate a significant difference between the number of colonies on Orvantis (resistance level = 5) and Lord (resistance level = 7) wheat cultivar leaves in Non-Mycorrhizal (NM) or Mycorrhizal (M) plants. *: indicates a significant difference between the number of colonies in NM and M plant leaves, for the same cultivar, according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Mean values resulted from 15 plants sampled from three different pots.

	Number of colonies/ leaf	
	Orvantis (resistance level = 5)	Lord (resistance level = 7)
NM	57.2 ±10 a	9.6 ±2 b
M (<i>Fm</i>)	13±4 a *	3.7±1.7 b *

d. On *Bgt* infection development.

The impact of cultivar resistance level on *Bgt* infection process was studied 48 hai and percentages of the different *Bgt* developmental stages (conidia with PGT only, abortive AGT, AGT without and with HS) investigated at the cytological level are summarized in table XII.

In NM plants, the Lord cultivar first exhibited a 2.3-fold lower percentage of conidia with PGT and a 6-fold higher percentage of abortive AGT, compared to Orvantis. We then observed 2-fold higher and a 16-fold lower percentages of AGT without HS and AGT with HS, respectively, in the Lord cultivar compared to Orvantis.

In Orvantis, no significant difference was found in the percentages of conidia with PGT only, and 8.6 and 9.2% were observed in M plants and NM ones respectively. In addition, AGT with HS was 2-fold less frequent in M plants (23.27%) compared to NM plants (48%). Similarly, in the Lord cultivar, the percentage of the PGT only stage remained unchanged (3 and 4%, respectively) in M plants compared to NM ones. However, the AGT with HS class was not represented in M plants compared to NM ones where a 3% percentage value was found (Table XII).

Table XII. Percentages of the different developmental stages of *Bgt* conidia (6.10^5 spores/ml) in Orvantis (resistance level = 5) and Lord (resistance level = 7) wheat cultivars. Plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, $[P/5] = 12.4 \text{ mg l}^{-1}$. PGT: primary germ tube; AGT: appressorial germ tube; HS: haustorium. All events were observed on the 3rd leaf from 5 distinct plants 48 hai. Different letters indicate a significant difference between Orvantis and Lord cultivars on Non-Mycorrhizal (NM) or Mycorrhizal plants by *Fm*. *: indicates a significant difference between NM and M plants by *Fm* for a given wheat cultivar according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

Conidia developmental stage	NM (%)		M (<i>Fm</i>) (%)	
	Orvantis (5)	Lord (7)	Orvantis (5)	Lord (7)
PGT only	9.28b	4a	8.62b	3a
Abortive AGT	1 a	6 b	10.34b *	0a*
AGT without HS	41.23 a	87 b	57.76 a *	97 b
AGT with HS	48.45b	3a	23.27b *	0a

e. *On auto-fluorescence associated with polyphenolic compounds accumulation in wheat epidermal leaf cells.*

The incidence of cultivar resistance level on auto-fluorescent papillae formation was then monitored and the fluorescence intensity was classified in three categories: class 0 for no fluorescent papilla seen beneath AGT; class 1 for weakly fluorescent papilla and class 2 for strongly fluorescent papilla. For each category, the presence of HS was also recorded. An additional type of event, whole-fluorescent cells was also counted (Figure 3) Percentages of each class of event are presented in Table XIII.

In NM wheat plants, the class 0 (absence of fluorescent papillae) was less frequent in Lord compared to Orvantis, irrespective of the presence or the absence of HS. The percentages of class 1 (weakly) and class 2 (strongly fluorescent papilla) without HS in NM plants were more frequent (31 and 16%) in Lord compared to Orvantis (6.81 and 0%), respectively. Conversely, in the presence of HS, these percentages were less frequent (3 and 0%) in Lord than in Orvantis (27.27 and 2.27%), respectively. Nevertheless, whole-cell fluorescence was observed 42-fold more often in NM Lord plants leaves than in Orvantis ones.

The inoculation of Orvantis with *Fm* led to more frequent fluorescent papillae corresponding to AGT without HS: 43.61 and 11.70% for weak and strong fluorescence intensity, respectively, compared to 6.81 and 0% in NM ones. However, in the presence of HS, the percentages of weakly fluorescent papillae were significantly lower (12.76%) in M plants compared to NM ones (27.27%). Conversely, strongly fluorescent papillae were more frequent (14.89%) in M plants in comparison to NM ones (2.27%).

Lord cultivar exhibited lower frequencies of both weakly and strongly fluorescent papillae in the absence of HS (23 and 9%) in M plants compared to NM ones (31 and 16%), while AGT with HS were no detected.

In M Orvantis and Lord plants, the presence of whole-cell fluorescence was 11-and 1.25 fold higher than in their respective NM controls, and reached 12,76 and 59%, respectively (Table XIII).

Table XIII: Percentages of AGT associated with auto-fluorescence at the penetration sites by *Bgt* (6.10^5 spores/ml) in Orvantis (resistance level = 5) and Lord (resistance level = 7) wheat epidermal cells with and without haustorium. Plants were irrigated with Hoagland's solution containing phosphorus at P/5 concentration, [P/5] = 12.4 mg l⁻¹. All events were observed 48 hai on the 3rd leaf from 5 plants. Different letters indicate a significant difference between Orvantis and Lord wheat of Non-Mycorrhizal (NM) or Mycorrhizal (M) plants by *Fm* according to the LSD test ($P \leq 0.05$).*: indicates a significant difference between NM and M plants for a given wheat cultivar according to the LSD test ($P \leq 0.05$).

<i>Bgt</i> appressorial germ tube (%)			NM		M (<i>Fm</i>)	
			Orvantis (5)	Lord (7)	Orvantis (5)	Lord (7)
			Without HS	No fluorescent papillae	37.5 b	3 a
	Weakly fluorescent papillae	6.81 a	31b	43.61 b*	23 a*	
	Strongly fluorescent papillae	0 a	16 b	11.70 a *	9 a	
With HS	No fluorescent papillae	23.86 b	0 a	1.06 a *	0 a	
	Weakly fluorescent papillae	27.27 b	3 a	12.76 b*	0 a	
	Strongly fluorescent papillae	2.27 a	0 a	14.89 b*	0 a	
	Auto-fluorescent cell	1.13 a	47 b	12.76 a *	59 b *	

Discussion

In the present study, we demonstrated that the efficacy of arbuscular mycorrhizal in protecting wheat against the biotrophic foliar pathogen *Bgt* was subjected to P concentration, arbuscular mycorrhizal inoculum type and wheat cultivar resistance level. In our culture conditions, a combination of *Fm* as mycorrhizal inoculum and a reduction of phosphorus supply at P/5 gave the better results in terms of protection against *Bgt* in wheat leaves. This protection was noticed in both Orvantis (moderately susceptible) and Lord (moderately resistant) wheat cultivars compared with NM plants. The protective arbuscular mycorrhizal effect against *Bgt* could be the result of mycorrhizal-induced resistance (MIR) as described by Nair et al. (2015) in the case of tomato plant resistance, colonized by *Glomus fasciculatum*, against the foliar pathogen *Alternaria alternata*. MIR confers protection against a wide range of root and foliar attackers, including hemibiotrophic and necrotrophic pathogens (Cameron et al. 2014).

Firstly, we showed that the lower tested P concentrations (P/5 and P/10) significantly reduced *Bgt* infection level not only in *Fm* M wheat plants, but also in NM plants, when comparing with the highest P concentration (P), suggesting that P concentration influenced

wheat infection by *Bgt*. In NM plants, the high P concentration may enhance the physiological plant status, and consequently *Bgt* development on leaf surface since this pathogen takes advantages from nutrients released in apoplast of epidermal cell walls. Spann and Schumann (2013) considered that plants with an optimal nutritional status have the highest resistance to pests and diseases. Then, high P supply may improve pathogen development. Likewise, we observed that when we deprived completely wheat plants from Hoagland's solution, *Bgt* symptoms did not appear on wheat leaves which were chlorotic and dwarf. Moreover, when Hoagland's solution containing all elements except P was used, NM wheat plants were stunted in growth and their leaves exhibited a reddish-purple color and the protection was similar to that obtained with P/10 concentration (data not shown). Our results are in agreement with those of Grandison et al. (1986) and Zafar (2003) who demonstrated that decreased P nutrition may not necessarily lead to an increased plant infection. Other studies reported delayed growth and decreased root/shoot ratio and stem numbers in many plant species grown in deficient P conditions (Atkinson 1973; Lynch et al. 1991; Mollier and Pellerin 1999). Nevertheless, when reducing P concentration to P/5, none of the measured growth parameters decreased, while plant length even increased.

Concerning protection rates obtained in *Fm* M plants compared to NM ones for a given P concentration, drastic increases by 4.4- and 7.8-fold were observed at P/5 and P/10 respectively, indicating that mycorrhizal inoculation in association with a suitable concentration of P supply improves even more wheat protection against *Bgt*. In parallel, our findings highlighted that a decrease of P concentration led to an increase in wheat root mycorrhizal colonization rate. It is generally accepted that high P concentration does not favor M colonization. Ratnayake et al. (1978) found that low P concentrations applied for 8-10 weeks increased the arbuscular mycorrhizal colonization of *Sorghum vulgare* compared to higher ones. Mycorrhizal rate enhancement at low P concentrations was explained by an increase in cell membrane permeability to monovalent cations, leading to the release of metabolites – such as soluble amino acids and sugars – in sufficient amounts to sustain the initial growth and development of mycorrhizal spore germination (Ratnayake et al. 1978; Grant et al. 2004). Some authors suggested that P acts also systemically by repressing plant symbiotic gene expression, in particular genes encoding enzymes of carotenoid and strigolactone biosynthesis as well as symbiosis-associated P transporters, subsequently inhibiting arbuscular mycorrhizal colonization in the root (Breuillin et al. 2010). However, an overexpression of plant endochitinase activity, known to inhibit AMF mycelia growth, was observed under high P condition (Lambais and Mehdy 1993).

Furthermore, in plants inoculated with *Fm*, our data showed that P concentration influenced M wheat growth. While reductions in plant length, leaf and stem numbers, and shoot dry weight were observed at P/10 compared to P, only leaf and stem numbers were reduced at P/5. Remarkably, values obtained in M plants are yet higher or similar to those obtained in NM plants at a given P concentration, except for plant length. Plant growth response to AMF colonization is controversial and is described as depending on the balance between a depressor effect due to fungal requirements, mainly photosynthesis products, and the benefits of interaction such as a better nutritional status of the plant host (Graham 2000). In our study, M colonization with *Fm* resulted in a noteworthy increase in root biomass at P/5 and P/10, which may refer to AMF establishment by increasing root length, ramification and dry weight. Similar results were obtained in cucumber plants colonized by *R. irregularis* or by *F. mosseae* (Habibzadeh 2015).

Finally, our results indicated that in plants inoculated with *Fm*, the highest protection against *Bgt* was obtained at P/10, in association with a high mycorrhizal rate, but not with a plant growth enhancement compared with NM plants at the same concentration. In addition, plant growth was reduced when compared to NM plants cultivated at P, which is the recommended dose in fields, ($P = 62 \text{ mg l}^{-1}$ or approximately 73 kg ha^{-1} of phosphorus, Le Souder et al. 1998). Thus, in our experimental conditions, P/5 concentration appears more suitable for mycorrhizal establishment and protection against *Bgt* while keeping good plant growth.

Nevertheless, the increased protection rate obtained in M plants at P/5 is not only linked to a high mycorrhizal rate, since *Fm* inoculum conferred the best wheat root colonization rate (38%), compared to *Ri* (19%) and SZE (8%), while inoculation with *Fm* and SZE gave the better similar protection rates.

The frequencies of conidia with PGT only in *Fm* M plants were close to that of NM plants, and higher than in both SZE and the lowest efficient inoculum *Ri*, suggesting that root inoculation by *Fm* does not trigger mechanisms which could impair AGT formation in leaves. Similar result was observed by Lee et al. (2005) for M cucumber by *R. irregularis* against anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*. Furthermore, the lower haustorium (HS) formation rates observed 48 and 72 hai in SZE and *Fm* M plants by microscopy pointed out their higher effectiveness to reduce *Bgt* infection compared to NM and *Ri* M plants. The establishment of a mature HS represents a key step for successful fungal reproduction, because it is the only organ that serves to feed the pathogen (Hückelhoven et al. 1999). Protection in M plants seems then to be related to an impaired haustorium establishment rather than to a reduced mycelium development in leaf epidermis. Moreover, this reduction in HS

formation was well correlated with the higher frequency of fluorescent papillae and/or whole auto-fluorescent cells at the penetration sites in SZE and *Fm* M plants as compared to *Ri* (the less protective inoculum) and NM plants, suggesting an accumulation of polyphenolic compounds. On the contrary, *Ri* M cucumber plants showed an increase in fluorescent papillae during the challenge with the *Colletotrichum orbiculare* (Lee et al. 2005). Papillae formation is known to contribute to the plant resistance by stopping pathogen penetration attempt in the barley powdery mildew system (Koga et al. 1990; Hückelhoven et al. 1999; Collins et al. 2003).

Castellanos-Morales et al. (2012) showed that *R. irregularis*, *F. mosseae* and *Gigaspora rosea* colonized barley roots to different extents, although the three AMF species have reduced similarly the infection by *Gaeumannomyces graminis*. Several authors mentioned that high AMF root colonization rates are not necessary for effective protection against fungal pathogens (Caron et al. 1986; García-Garrido and Ocampo 1988; St-Arnaud et al. 1997; Kapoor 2008; Castellanos-Morales et al. 2012), while other authors showed that protection against pathogens was linked to mycorrhizal colonization levels prior to the challenge with the pathogen (Cordier et al. 1998; Slezack et al. 2000; Khaosaad et al. 2006; Fernández et al. 2014). *Fm* was found to have the strongest ability to colonize wheat root in our conditions. Several studies found that *F. mosseae* has more bioprotective effect than *R. irregularis* against pathogens (Pozo et al. 2002; Shrinkhala 2011). It was demonstrated that *F. mosseae* induced changes in the balance of plant-defense phytohormones such as salicylic acid, abscisic acid, and jasmonates to a greater extent compared to *R. irregularis* (Fernández et al. 2014).

Fm ability to colonize plants compared to *Ri*, was frequently observed with other plants like papaya and cucumber (Sharda Khade and Rodrigues 2009; Habibzadeh 2015), may be because *F. mosseae* is the most frequent AMF species associated with terrestrial plants from different regions of the world (Blaszkowski et al. 2001). Taken together, our results suggested that the protection rate against powderymildew did not depend necessarily on the root colonization level in suitable phosphorus supply, but rather on the mycorrhizal inoculum type (AMF species or stains, formulation).

Concerning the effect of mycorrhizal inoculum type on plant growth, the lengths of M plants decreased compared to NM ones whatever the inoculum tested (*Fm*, SZE or *Ri*), whereas increases in shoot dry weight in *Ri* and *Fm* mycorrhizal wheat were observed. This may reflect a larger leaf width compared to SZE or NM plants (data not shown). Additionally,

our results showed that *Fm* inoculation increased both root and shoot dry weight. Likewise, Joner and Leyval (2001) observed that *F. mosseae* increased clover shoot and root dry weight compared to NM ones, whereas shoot dry weight of ryegrass was not affected. Elsewhere, the inoculation of peach by *F. mosseae* showed that this species enhanced plant length and total (root and shoot) dry weight compared to other inocula (*G. versiforme* and *Paraglomus occultum*) and NM plants (Wu et al. 2011). The whole of the results suggest that plant growth enhancement depends both on AMF and plant species. Moreover, wheat inoculation by *Ri* led to the highest shoot dry weight but to the lowest wheat protection despite a mycorrhizal rate of 19%. Once again, it appears that the protection against *Bgt* is neither related to an enhanced plant shoot biomass nor to the mycorrhizal rate level under satisfactory P supply.

In the other hand, our results emphasized that Lord (moderately resistant cultivar) exhibited a *Bgt* infection level 6-fold lower compared to Orvantis (moderately susceptible cultivar) in NM wheat plants under our culture conditions. The *Bgt* symptoms reduction observed in the present study on Lord wheat cultivar is in accordance with the disease level reported for this cultivar in the field conditions.

The reduction of HS formation is the major event that may explain the higher protection observed in NM Lord in comparison to NM Orvantis cultivar. Polyphenolic compounds accumulation at *Bgt* penetration sites seems to be highly involved in reducing HS formation in this cultivar, and mainly through HR-like reaction since about 50% of AGT led to whole-fluorescent cell observation compared to 1% in Orvantis cultivar. This suggests an active and rapid death of attacked epidermal cells, corresponding to HR during incompatible interactions, which can be visualized by whole-cell auto-fluorescence under UV excitation (Hückelhoven et al. 1999; Görg et al. 1993). In the absence of HS formation, weakly and strongly fluorescent papillae percentages were also higher in Lord compared to Orvantis. All these cytological phenomena resulted in a 6-fold symptom reduction in the more resistant cultivar Lord.

Addition of *Fm* inoculum improved the protection rates by 4.4- and 2.6 fold respectively in Orvantis and Lord compared to their respective NM controls. This finding is in accordance with the study of Mark and Cassels (1996) who found that different strawberry genotypes inoculated with *Glomus fitulosum* showed different susceptibility levels to *Phytophthora fragariae*. When the two susceptible clones to the pathogen (the first one was highly and the second was poorly) colonised with mycorrhizal fungi, after colonization, they became resistant to *P. fragariae*. However, in our study, while *Fm* inoculum addition to both cultivars

differing in their resistance level improved protection rates against *Bgt*, associated cytological events were distinct. In the Orvantis cultivar, in response to mycorrhizal inoculation, auto-fluorescent papillae associated with the absence of HS were the most frequent event, followed by whole auto-fluorescent cells, which reached 13% of the total events. In contrast, in M Lord plants, whole auto-fluorescent cells percentage increased and reached 59% of the events, being the main cytological event associated with induced resistance in this cultivar. The review of Cameron et al. (2014) presented that MIR has been first associated with cell wall apposition. Several studies demonstrated the role of MIR against mostly soil-borne pathogens inducing cytological modifications in epidermal M root cell level by increased cell wall thickenings, cytoplasmic granulation and accumulation of some antimicrobial substances (phenolic compounds) (Cordier et al. 1998; Pozo et al. 2002; Zhu and Yao 2004; Abdel-Fattah et al. 2011). Nevertheless, far as we know, no previous study reported these cytological changes in the case of foliar pathogen, but other defense mechanisms were demonstrated to contribute to MIR. It was shown that the AMF induced resistance of soybean against *Phytophthora sojae* resulted from the release of hydrogen peroxide and the accumulation of jasmonic acid (Li et al. 2013). Additionally, an eliciting effect of M inoculation on leaf tissues under non-infectious conditions was observed, via a stimulation of PR-proteins gene expression in alfalfa against *Xanthomonas campestris*, in potato plants to *Phytophthora infestans* and in rice against *Magnaporthe oryzae* (Liu et al. 2007; Gallou et al. 2011; Campos-Soriano et al. 2012).

In parallel, our findings showed that root mycorrhizal rate was higher in Orvantis than in Lord, the more resistant wheat cultivar, suggesting that root colonization rate depends on cultivar resistance level. These results are in agreement with those of Khalil et al. (1999) who showed that three cultivars of soybean plants were colonized differently by *Gigaspora margarita*. Several studies, under pot conditions, showed that new wheat cultivars have less extensive mycorrhizal colonization than older cultivars (Hetrick et al. 1993; Zhu et al. 2001). Because of the older ones have lost their resistance to diseases over time, it is assumed that breeding for resistance to diseases could result in a resistance to mycorrhizal fungi (Khalil et al. 1999; Parke and Kaeppler 2000).

Additionally, our results showed that both M and NM Lord plants exhibited lower leaf and stem numbers and subsequently shoot dry weight compared to Orvantis. This reduction in growth compared to Orvantis could help to reduce plant density and subsequently humidity ratio, which is an important factor for *Bgt* infection (Seutin et Bodso 2012). Such a wheat

growth-cultivar resistance level relationship in both M and NM conditions has never been described so far. However Mark and Cassels (1996) demonstrated in different strawberry clones that the positive correlation between mycorrhizal root colonisation and growth effects in the genotypes was not reflected in their respective susceptibility to *Phytophthora fragariae* infection.

In summary, this study highlighted the ability of different AMF inoculum to protect wheat against the biotrophic fungus *Bgt*. We found that this bioprotective effect depends on different parameters including P concentration, inoculum type and cultivar resistance level. A decrease of P supply results in an increased wheat root colonization rate and decreased overall both wheat growth and *Bgt* infection. However, a high M rate didn't necessarily produce a high wheat protection. *Fm* conferred the highest wheat protection against *Bgt* followed by SZE and finally *Ri*. The moderate P/5 phosphorus concentration led to suitable wheat root colonization rate, plant growth and wheat protection to *Bgt*. However, a high M rate didn't necessarily produce a high wheat protection since *Fm* conferred the highest wheat protection against *Bgt* followed by SZE and finally *Ri*, while the mycorrhizal rate obtained with SZE® was lower than that obtained with *Fm* and *Ri*. *Bgt* infection process is reduced through papillae and the whole auto-fluorescent cell formation via polyphenolic compound accumulation, and subsequently reducing HS formation. Both the moderately susceptible and the more resistant cultivars were protected by *Fm* inoculation at P/5. However, mechanisms which are involved in this protection appear rather different in both cultivars, and the analysis of gene expression, such as genes encoding for pathogenesis-related proteins-PR, estimation of plant defense hormones (salicylic acid and jasmonates) and testing another AMF species, deserve to be investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Higher Education in Syria mediated by Aleppo University.

References

- Abdel-Fattah, GM El-Haddad SA, Hafez EE, Rashad YM (2011) Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. Microbiol. Res 166: 268–281.
- Atkinson D (1973) Some general effects of phosphorus deficiency on growth and development. New Phytol 72: 101–111.

- Bapaume L, Reinhardt D (2012) How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Front. Plant Sc.* 3: 223.
- Pineda A, Zheng SJ, Van Loon JJA, Pieterse CMJ, Dicke M (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci* 15: 507–514.
- Blaszkowski J, Tadych M, Madej T, Adamska I, Iwaniuk A (2001) Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycota) of Israeli soils. *Mat. II Polsko-Izraelskiej Konf. Nauk. nt. „Gospodarowanie zasobami wodnymi i nawadnianie roślin uprawnych”*. *Przegląd naukowy Wydz. Inz. Kształt. Srod* 22: 8–27.
- Breullin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P (2010) Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal* 64: 1002–1017.
- Buchenauer H, Hellwald KH (1985) Resistance of *Erysiphe graminis* on barley and wheat to sterol C-14-demethylation inhibitors. *EPPO Bulletin* 15: 459–66.
- Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM, Jurriaan Ton (2014) Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci* 18: 539–545.
- Campos-Soriano, García-Martínez J, San Segundo B (2012) The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defense-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular plant pathology* 10: 1364–3703.
- Caron M, Fortin JA, Richard C (1986) Effect of inoculation sequence on the interaction between *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8: 12–16.
- Carver TLW, Robbins MP, Zeyen RJ (1991) Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host cell responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 269–287.
- Castellanos-Morales V, Cárdenas-Navarro R, García-Garrido JM, Illana A, Ocampo J.A, Steinkellner S, Vierheilig H (2012) Bioprotection against *Gaeumannomyces graminis* in barley: a comparison between arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil Environ* 58: 256–261.
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qui JL, Huckelhoven R, Stein M, Freialdenoven A, Somerville SC, and Schulze-Lefert P (2003) Snare-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425: 973–007.
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact* 11: 1017–1028.
- Cozzolino V, Pigna M, Di Meo V, Caporale AG, Violante A (2010) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus supply on the growth of *Lactuca sativa* L. and arsenic and phosphorus availability in an arsenic polluted soil under non-sterile conditions. *Applied Soil Ecology* 45: 262–268.
- Fernández, Merlos M, López-Ráez JA, Martínez-Medina A, Ferrol N, Azcón C, Bonfante P, Flors V, Pozo MJ (2014) Defense Related Phytohormones Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbioses Depends on the Partner Genotypes. *J Chem Ecol* 40: 791–803.
- Fiorilli V, Catoni M, Francia D, Cardinale F, Lanfranco L (2011) The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* 93: 237–242.
- Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjaer MF, Thordal-Christensen H, Pons-Kuehnemann J (2006) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16: 413–419.
- Gallou A, Mosquera H PL, Cranenbrouck S, Suárez JP, Declerck S (2011) Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76: 20–26.

- García Garrido JM, Ocampo JA (1988) Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol* 110: 551–555.
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519–530.
- Gilbert N (2009) Environment: the disappearing nutrient. *Nature* 461: 716–718.
- Grandison GS, Cooper KM (1986) Interaction of Vesicular-ArbuscularMycorrhizae and Cultivars of Alfalfa Susceptible and Resistant to *Meloidogyne hapla*. *Journal of Nematology* 18: 141-149.
- Görg R, Hollricher K, Schulze-Lefert P (1993) Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant J* 3: 857–866.
- Graham JH (2000) Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. In: Podila GK, DoudsDD (eds) Current advances in mycorrhizae research. Minnesota, USA: APS Press 127–140.
- Grant C, Bittman S, Montrea M, Plenchette C, Morel C (2004) Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Can. J. Plant Sci* 85: 3–14.
- Habibzadeh Y (2015) The effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus levels on dry matter production and root traits in cucumber (*cucumis sativus* L.). *African Journal of Environmental Science and Technology* 9: 65–70.
- Harrison MJ, Van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626–629.
- Heaney SP, Hall AA, Davies SA, Olaya G (2000) Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. *Proceedings of the British Crop Protection Conference: Pests and Diseases 2000*. Farnham, Surrey, UK: British Crop Protection Council 755–62.
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS (1993) Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties and ancestors: a synthesis,” *Canadian Journal of Botany* 71, pp. 512–518.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn* 347.
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K (1999) Hypersensitive Cell Death and Papilla Formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus Are Associated with Hydrogen Peroxide but Not with Salicylic Acid Accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251–1260.
- Joner EJ, Leyval C (2001) Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10: 155–159.
- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ (2012) Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J. Chem. Ecol* 38: 651–64.
- Hao Z, Fayolle L, Van Tuinen D, Chatagnier O, Li X, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2012) Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defense gene responses in grapevine. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/ers046
- Kapoor R (2008) Induced resistance in mycorrhizal tomato is correlated to concentration of jasmonic acid. *On Line J Biol Sci* 8:49–56.
- Khalil S, Loynachan TE, Tabatabai AM (1999) “Plant determinantsof mycorrhizal dependency in soybean,” *Agronomy Journal* 91: 135–141.
- Khaosaad T, Vierheilig H, Nell M, Zitterl-Eglseer K, Novak J (2006) Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16: 443–446.

- Khaosaad T, Garcia-Garrido JM, Steinkellner S, Vierheilig H (2007) Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 727–734.
- Koga H, Bushnell WR, Zeyen RJ (1990) Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp *hordei*. *Can. J. Bot.* 68: 2344–2352.
- Kumar S, Sharma AK, Rawat SS, Jain DK, Ghosh S (2013) Use of pesticides in agriculture and livestock animals and its impact on environment of India. *Asian J. Environ. Sci* 8: 51–57.
- Lambais MR, Mehdy MC (1993) Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 6: 75–83.
- Le Souder C, Mazieres C, Rodes V (1998) AGRESTE – LES CAHIERS, N°30.
- Lee CS, Lee YJ, Jeun YC (2005) Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhizal *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathol J* 21: 237–243.
- Li T Lin G Zhang X Chen YL Zhang SB Chen BD (2014) Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-014-0578-3>
- Li Y, Liu Z, Hou H, Lei H, Zhu X, Li X, He X, Tian C (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi-enhance resistance against *Phytophthora sojae* infection on soybean leaves is mediated by a network involving hydrogen peroxide, jasmonic acid, and the metabolism of carbon and nitrogen. *Acta Physiol Plant* 35: 3465–3475.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant Journal* 50: 529–544.
- Lowry OH, Rosebroughi NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265–275.
- Lynch JP, Lauchli A, Epstein E (1991) Vegetative growth of the common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Science* 31: 380–387.
- Mark GL, Cassells AC (1996) Genotype-dependence in the interaction between *Glomus fistulosum*, *Phytophthora fragariae* and the wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Soil* 185: 233–239.
- Mcgonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495–501.
- Mollier A, Pellerin S (1999) Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany* 50: 487–497.
- Mustafa G, Tisserant B, Randoux B, Fontaine J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Reignault Ph (2014) Mechanisms involved in mycorrhizal wheat protection against powdery mildew. *Commun Agric Appl Biol Sci* 79: 403–10.
- Nair A, Kolet SP, Thulasiram HV, Bhargava S (2015) Systemic jasmonic acid modulation in mycorrhizal tomato plants and its role in induced resistance against *Alternaria alternate*. *Plant Biology* ISSN 1435–8603.
- Ohtomo R, Saito M (2005) Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 67: 571–578.
- Oruc HH (2010) Fungicides and Their Effects on Animals. Pages 349-362. In; Fungiceds. Carisse, O (Ed) *Agricultural and Biological Sciences* 541 pp.

Parke JL, Kaeppeler SA (2000) Effects of genetic differences among crop species and cultivars upon the arbuscular mycorrhizal symbiosis, in *ArbuscularMycorrhizas: Physiology and Function*, Y. Kapulnik and DD. Douds, Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158–161.

Pozo MJ, Jung SC, Martínez-Medina A, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C, Barea JM (2013) Root Allies: Arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with biotic stresses. R. Aroca (ed.), *Symbiotic Endophytes*, Soil Biology pp 37.

Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2002) Localized vs systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp Bot* 53: 525 – 534.

Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM (1999) β -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science* 141: 149–157.

Pozo MJ, Dumas-Gaudot E, Azcón-Aguilar C, Barea JM (1998) Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *phytophthora parasitica*. *Journal of experimental botany* 49: 1729–1739.

Randoux B, Renard D, Nowak E, Sanssené J, Courtois J, Durand R,Reignault Ph (2006) Inhibition of *Blumeriagraminis* f. sp. *tritici* Germination and Partial Enhancement of Wheat Defenses by Milsana. *Phytopathology* 96: 1278–1286.

Ratnayake M, Leonard RT, Menge JA (1978) Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol* 81: 543–552.

Rouphael Y, Cardarelli M, Di Mattia E, Tullio M, Rea E, Colla G (2010) Enhancement of alkalinity tolerance in two cucumber genotypes inoculated with an arbuscular mycorrhizal biofertilizer containing *Glomus intraradices*. *Biol. Fertil. Soil* 46: 499–509.

Sanders FE, Tinker PB (1973) Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science* 4: 385–395.

Sharda Khade W,Rodrigues BF (2009) Studies on arbuscular mycorrhisation of papaya. *African Crop Science Journal* 17: 155–165.

Shrinkhala M (2011) Study on the bioprotective effect of endomycorrhizae against *M. graminicola* in rice.Thèse Seutin

B, Bodso B (2012) Livre blanc « céréales » Ulg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA –W Gembloux.

Slezack S, Dumas–Gaudot E, Paynot M, Gianinazzi S (2000) Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisumsativum* roots against. *Aphanomyces euteiches*? *Molecular Plant-MicrobeInteraction*, 13: 238–241.

Smith FA, Grace EJ, Smith SE (2009) More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 182: 347–358.

Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. UK: Academic Press.

Spann TM, Schumann AW (2013) Mineral Nutrition Contributes to Plant Disease and Pest Resistance. UF/IFAS Extension.

St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (1997) Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the non-Vam species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Can J Bot* 75: 998–1005.

Steinkellner S, Hage-Ahmed K, García-Garrido J. M., Illana A, Ocampo JA, Vierheilig H (2011) A comparison of wild-type, old and modern tomato cultivars in the interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycorrhiza* 22: 189–94.

Temperini O, Roupael Y, Parrano L, Biagiola E, Colla G, Mariotti R, Rea E, Rivera CM (2009) Nursery inoculation of pepper with arbuscular mycorrhizal fungi: An effective tool to enhance transplant performance. *Acta Hort.* (ISHS) 807: 591–596.

Trotta A, Vaneseg C, Gnavie, Fascona, Sampo S, Bertag (1996) Le rôle des champignons mycorrhiziens et les micro-organismes non-mycorhiziens dans la nutrition fer d'agrumes. *Biol du sol Biochem* 24: 857–864.

Vargas JM Jr (1973) A benzimidazole resistant strain of *Erysiphe graminis*. *Phytopathology* 63: 1366–1368.

Wanlei W, Yong L, Chen J, Xianglong J, Haibo Z, Guang W (2009) Impact of intercropping aphid resistant wheat cultivars with oilseed rape on wheat aphid (*Sitobion avenae*) and its natural enemies. *Acta Ecologica Sinica* 29 p. 186–191.

Wu QS, Li GH, Zou YN (2011) Roles Of Arbuscular Mycorrhizal Fungi On Growth And Nutrient Acquisition of Peach (*Prunus persica* L. Batsch) Seedlings. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 21: 746–750.

Yokoyamai K, Aist JR, Bayles CJ (1991) A papilla-regulating extract that induces resistance to barley powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 71–78.

Zafar U (2003) effect of different levels of P on two cultivars of cotton differing in resistance to leaf curl virus. *Pakistan*, 116 p.

Zhu HH, Yao Q (2004) Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *J Phytopathology* 152: 537–542.

Zhu, YG, Smith SE, Barritt AR, Smith FA (2001) Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant and Soil* 237: 249–255.

Conclusion et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Jusqu'à présent, la lutte contre *B. graminis* f. sp. *tritici*, agent de l'oïdium du blé, fait appel principalement à la culture de cultivars résistants et à l'usage intensif et systématique de fongicides de synthèse, ces derniers posant des problèmes environnementaux et de santé humaine. En outre, malgré le développement de nouveaux fongicides, les agriculteurs se trouvent confrontés à l'émergence de souches résistantes et au manque de durabilité de la lutte chimique. Il est donc nécessaire de développer des alternatives à cette lutte chimique, pour une agriculture plus durable et plus respectueuse de la santé de l'Homme et de son environnement. Dans ce contexte, la lutte biologique contre les maladies cryptogamiques du blé grâce aux CMA pourrait constituer une alternative prometteuse, de par la présence de ces champignons symbiotiques dans la rhizosphère des agro-écosystèmes et les bénéfices qu'ils procurent aux plantes en termes d'amélioration de la croissance et de tolérance aux stress, notamment biotiques. A ce jour, le potentiel des CMA comme outils de biocontrôle des maladies foliaires a été peu étudié notamment contre les maladies causées par des champignons biotrophes, et jamais encore dans le cas du pathosystème blé/oïdium.

Au cours de cette thèse, les travaux réalisés ont conduit, tout d'abord, à la mise au point d'une méthode de mycorhization chez le blé suite à l'ajout d'un inoculum mycorhizien commercial en conditions de culture sur substrat artificiel. Après 6 semaines de culture en pots, dans des conditions contrôlées et optimisées et en présence de l'inoculum mycorhizien à base du CMA *F. mosseae* (*Fm*), un taux de mycorhization de 38% des plants de blé et une augmentation des biomasses sèches racinaire et foliaire ont été obtenus. Parallèlement à ces effets positifs de la mycorhization, un taux de protection contre *Bgt*, estimé à 78%, a été observé sur les feuilles de blé mycorhizé, suggérant l'induction d'une résistance systémique. Les mécanismes impliqués dans cette protection sont liés à une induction de réactions de défense. Au moment de l'infection de la plante par *Bgt*, une réduction du nombre d'haustoria formés a été observée au niveau des cellules épidermiques des feuilles de blé mycorhizé, avec une accumulation de composés phénoliques et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), soit au niveau des papilles formées, soit au niveau de la cellule entière. Des suivis d'accumulation de transcrits dans les feuilles de blé mycorhizé, en absence de toute infection par *Bgt*, ont mis en évidence une surexpression de gènes codant pour des marqueurs de défense comme la *POX*, conduisant à l'oxydation de plusieurs substrats phénoliques permettant la formation de la lignine en présence d' H_2O_2 , la *PAL*, enzyme catalysant la principale étape d'entrée dans la

voie de synthèse des phénylpropanoïdes, la chitinase capable d'hydrolyser la chitine des parois fongiques et NPR1 connu comme être un élément clé de la régulation de la SAR chez les plantes.

L'ensemble de nos résultats démontre que la protection obtenue contre l'oïdium du blé en réponse à l'inoculation mycorhizienne pourrait correspondre à une Résistance Induite par la Mycorhization (ou MIR pour « Mycorrhiza-induced resistance »). Dans nos conditions, les mécanismes associés à la MIR ont conduit à la réduction du niveau d'infection par *Bgt* (principalement en empêchant la formation de l'haustorium) et à une élicitation des défenses de type systémique plutôt qu'une potentialisation (« priming ») de celles-ci dans les feuilles de blé mycorhizé.

Afin d'optimiser l'efficacité à protéger le blé contre *Bgt* via le phénomène de MIR, dans la seconde partie de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de différents paramètres susceptibles d'influencer le taux de mycorhization et/ou l'efficacité de la protection induite. Nos résultats ont montré que la concentration de P, le type d'inoculum mycorhizien et le niveau de résistance du cultivar de blé, font partie des paramètres importants à prendre en considération lorsque l'on souhaite favoriser la protection du blé par les CMA. Une réduction par 5 de la dose apportée de P préconisée au champ augmente le taux de mycorhization des plants de blé par *Fm* de 2,3 fois tout en doublant son taux de protection contre l'oïdium. Néanmoins, une trop forte diminution de l'apport de P va limiter la croissance de la plante, perte qui n'est pas compensée par la mycorhization.

Parmi les 3 inocula testés à P/5, le meilleur taux de mycorhization (38%) et de protection du blé contre *Bgt* (pouvant atteindre 78%) ont été associés à l'ajout de *Fm*. Dans le cas des deux autres inocula, alors qu'un taux de mycorhization a été évalué à 19% avec *Ri* et à 8% avec SZE, un meilleur taux de protection a été obtenu avec SZE (58%) par rapport à *Ri* (19%). Que ce soit avec *Fm* ou SZE, la protection résulterait de la réduction du nombre d'haustoria formés. Ainsi, au regard de ces résultats, nous pouvons suggérer que le taux de protection n'est pas forcément lié au taux de mycorhization, mais plutôt au type d'inoculum. En effet, il est à signaler que les inocula testés diffèrent par les espèces/souches de CMA qui les constituent mais aussi par leur formulation.

Par ailleurs, la mycorhization aboutit à une protection chez les deux cultivars utilisés, Orvantis modérément sensible, et Lord plus résistant. Néanmoins, les mécanismes de défense induits se traduisent par une accumulation des composés phénoliques dans l'ensemble de la

cellule chez le cultivar le plus résistant et au niveau des papilles et/ou dans l'ensemble de la cellule chez le plus sensible.

L'ensemble des résultats, obtenus lors de la présente thèse, mettent en évidence le potentiel des CMA comme agents de biocontrôle des maladies foliaires et en particulier l'intérêt de proposer l'inoculation du blé par les CMA comme moyen de lutte alternative contre l'oïdium. Il est toutefois important de bien définir les conditions, notamment en termes de doses optimales des éléments nutritifs minéraux tels que le P, susceptible d'assurer une croissance végétale satisfaisante, ainsi qu'un taux de mycorhization suffisant à la mise en place du phénomène de MIR, mais aussi de choisir l'inoculum mycorhizien adéquat ayant la capacité de protéger le cultivar le plus adapté de la culture.

L'ensemble de ses résultats permettent d'envisager plusieurs perspectives parmi lesquelles:

(1) Compléter l'étude des mécanismes de défense impliqués dans la protection suite à la mycorhization:

- a. en recherchant d'autres marqueurs de résistance induite. En effet, nos résultats ont décrit chez les feuilles des plantes mycorhizées une induction des gènes cibles hors contexte infectieux alors qu'ils étaient réprimés en contexte infectieux, ce qui suggère que *Bgt* serait capable de moduler, lors de l'infection, des défenses activées lors de la mycorhization. Nous pourrions ainsi cibler des gènes codant pour d'autres protéines PR comme la PR1 (connue pour être un bon marqueur de la SAR induisant une réponse à différents pathogènes), la PR2 (glucanase), la LTP (protéine de transfert des lipides) impliquée dans la résistance du blé contre *Bgt*. Nous pourrions aussi nous intéresser plus particulièrement aux différents gènes codant pour des protéines intervenant dans le renforcement des parois ou la formation de papilles (dépôt de callose, accumulation de composés phénoliques) comme la CAD (coumaroyl alcohol dehydrogenase, intervenant dans la voie de synthèse de la lignine), la chalcone isomerase (CHI) et la chalcone synthase (CHS), intervenant dans la voie de synthèse de flavonoïdes.
- b. en étudiant les phénomènes retrouvés au niveau des tissus racinaires de la plante susceptibles d'être en interaction avec le champignon mycorhizien. Par exemple, nous pourrions effectuer des dosages de métabolites signaux comme l'AJ, l'AS ou l'ET, mais également un suivi de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la production de ces composés intervenant dans la résistance systémique.

c. en utilisant d'autres approches plus globales, qu'il s'agisse d'études transcriptomiques, protéomique ou métabolomique, qui permettraient d'identifier d'autres voies ou métabolites qui seraient mobilisés chez le blé mycorhizé et potentiellement impliqués dans les phénomènes de résistance du blé contre *Bgt*.

(2) Optimiser les conditions permettant la protection du blé

a. en déterminant le temps nécessaire pour obtenir une protection du blé après inoculation par le champignon mycorhizien.

b. en testant d'autres espèces de CMA comme *Glomus fasciculatum*, *Gigaspora gigantea*, *G. etunicatum* et *Gigaspora rosea* dont l'efficacité contre des agents phytopathogènes responsables de maladies racinaires a été montré chez le poivron, la luzerne et l'orge respectivement.

c. en étudiant l'impact d'autres paramètres abiotiques pouvant influencer la mycorhization tels que la température, l'hygrométrie, les éléments nutritifs minéraux autre que le P.

d. en testant différentes combinaisons de traitement à base de (i) différentes espèces de CMA, (ii) un inoculum mycorhizien et des bactéries bénéfiques (PGPR) comme *Pseudomonas* sp. ou *Bacillus* sp., ou des champignons bénéfiques (PGPF) comme *Trichoderma harzianum* (iii) un inoculum mycorhizien et l'application de SDP bio-sourcés, (iv) un inoculum mycorhizien et des doses réduites de fongicides.

(3) La « MIR » est souvent considérée comme un état de résistance systémique très proche de l'état d'ISR induit par des bactéries bénéfiques. L'ISR est reconnue pour entraîner une résistance de la plante contre un large spectre d'agents pathogènes; il serait intéressant de tester l'effet de la mycorhization du blé contre un autre pathogène du blé, comme par exemple le champignon hémibiotrophe *Mycosphaerella graminicola*, agent de la septoriose, maladie responsable d'importantes pertes de rendement chez le blé.

(4) Enfin, il serait intéressant de tester l'efficacité de la mycorhization contre les maladies foliaires à l'échelle du champ. Un état des lieux des conditions de mycorhization du blé dans les champs (isolement et identification des CMA autochtones, caractéristiques pédo-agronomiques du sol,...) peut être envisagé, en lien avec les pratiques culturales.

Références bibliographiques

A

- Abbott LK and Robson AD. 1991a. Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. *J. Agric. Ecos. Envir* 35: 121–150.
- Abdel-Fattaha GM, El-Haddadb SA, Hafezc EE, Rashad YM. 2010. Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiological Research* 166: 268–281.
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit Jr ME. 1992. Ethylene in plant biology, 2nd edn. San Diego: Academic Press.
- Abohatem M, Chakrafi F, Jaiti F, Dihazi A, Baaziz M. 2011. *The Open Horticulture Journal* 4:10–16.
- Adhikari TK, Balaji B, Breeden J, Goodwin SB. 2007. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 55–68.
- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R. 2007. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1665–1681.
- Ahn IP, Kim S, Lee YH, Suh SC. 2007. Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143: 838–848.
- Aist JR, Bayles CJ, Tao W, Berns MW. 1991. Direct experimental evidence for the existence, structural basis and function of astral forces during anaphase B in vivo. *J. Cell Sci* 100: 279–288.
- Aist JR, Gold RE, Bayles CJ, Morrison GH, Chandra S, Israel HW. 1988. Evidence that molecular components of papillae may be involved in ml-o resistance to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 17–32.
- Akhtar MS, Siddiqui ZA. 2008. Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp and *Pseudomonas straita*. *Crop Protection* 27: 410–417.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827.
- Alejo-Iturvide F, Márquez-Lucio MA, Morales-Ramírez I, Vázquez-Garcidueñas MS, Olalde-Portugal V. 2008. Mycorrhizal protection of *chili* plants challenged by *Phytophthora capsici*. *J Plant Pathol* 120:13–20.
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7327– 7331.
- Allen MF, Allen EB, Friese CF. 1989. Responses of the non-mycotrophic plant *Salsola kali* to invasion by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 111: 45–49.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60: 377–390
- Anderson JM. 1989. Membrane derived fatty acids as precursors to second messengers. In WF Boss, DJ Morre (eds), *Second Messengers in Plant Growth and Development*, Vol 6. Alan R. Liss, New York, pp 181–212.
- Aroca R, Bago A, Sutka M, Paz JA, Cano C, Amodeo G, Ruiz-lozano JM, Microbiología DDe, Experimental E. 2009. Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Mol. Plant-Microbe Interact* 22: 1169–1178.
- Aroca R, Ferrante A, Vernieri P, Chrispeels MJ. 2006. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany* 98: 1301–1310.
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2007. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* 173: 808–816.
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Hofte M. 2008. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant Microbe Interact* 21: 709–719.
- Atkinson D. 1973. Some general effects of phosphorus deficiency on growth and development. *New Phytologist* 72: 101–111.

- Audenaert K, De Meyer GB, Hofte MM. 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128: 491–501.
- Augé RM. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3–42.
- Avdiushko SA, Ye XS, Hildebrand DF, Kuc J. 1993. Induction of lipoxygenase activity in immunized cucumber plants. *Physiological Molecular Plant Pathology* 42: 83–95.
- Azcon R, Ocampo JA 1981. Factors affecting the vesicular arbuscular infestation and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytologist* 87: 677–685.
- Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Abreu CEB, Gomes-Filho E. 2005a. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salttolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environ. Exp. Bot. in press*. doi:10.1016/j.envexpbot. 01.008.

B

- Badri DV, Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 32: 666–681.
- Bago B, Chamberland H, Goulet A, Vierheilig H, Lafontaine JG, Piché Y. 1996. Effect of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Protoplasma* 192: 80–92.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeiffer PE, Shachar-hill Y. 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol* 128: 108–124.
- Bagyaraj DJ, Manjunath A, Reddy DDR. 1979. Interaction of vesicular arbuscular mycorrhizas in some tropical aquatic plants. *Transactions of the British Mycological Society* 72:164–167.
- Balestrini R, José-Estanyol M, Puigdoménech P, Bonfante P. 1997. Hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA accumulation in maize root cells colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by *in situ* hybridization. *Protoplasma* 198: 36–42.
- Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF. 2011. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of experimental botany* 62: 1049–1060.
- Bapaume L, Reinhardt D. 2012. How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Front. Plant Sc.* 3: 223.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56: 1761–1778.
- Bécard G, Pfeiffer PE. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* 174: 62–68.
- Belanger R, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW. 2002. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L. 2005. Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620–627.
- Benhamou N, Fortin JA, Hamel C, St-Arnaud M, Shatilla A. 1994. Resistance responses of mycorrhizal *Ri* T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathol* 84: 958–968.
- Benhamou N, Picard K. 1999. Induced resistance: a novel plant defense strategy against pathogens. *Phytoprotection* 80: 137–168
- Benhamou N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathway. *Trends Plant Sci.* 1: 233–240.
- Bent AF. 2001. Plant mitogen-activated protein kinase cascades: Negative regulatory roles turn out positive. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 784–786.
- Bernard JL, Rameil V. 2005. Fongicides: évolutions contrastées. *Phytoma* 584: 18–21.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4: 226.

- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei, G, King J. 2009b. Gene expression profiling and silencing reveal that monoglignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of Experimental Botany* 60: 509–521.
- Bidleman T, Walla MD, Roura R, Carr E, Schmidt S. 1993. Organochlorine pesticides in the atmosphere of the Southern Ocean and Antarctica. *Marine pollution Bulletin* 26: 258–262.
- Blaszkowski J, Tadych M, Madej T, Adamska I, Iwaniuk A. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycota) of Israeli soils. Mat. II Polsko-Izraelskiej Konf. Nauk. nt. “Gospodarowanie zasobami wodnymi i nawadnianie roślin uprawnych”. Przegląd naukowy Wydz. Inz. Kształt. Srod 22: 8–27.
- Blée E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* 7: 315–322.
- Blee KA, Anderson AJ. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, Schenk & Smith. *Plant Physiology* 110: 675–688.
- Blee KA, Anderson AJ. 2000. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. In: Podila GK, Douds DD, eds. Current advances in mycorrhizae research. Minnesota, USA: The American *Phytopathological Society* 27–44.
- Blee E. 1998. Biosynthesis of phytooxylipins: the peroxygenase pathway. *Fett* 100: 121–127.
- Blilou I, Bueno P, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2000. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycological Research* 104:722–725.
- Blilou I, Ocampo JA, García-Garrido JM. 1999. Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *Journal of Experimental Botany* 50: 1663–1668
- Bolandnazar S, Aliasgarzad N, Neishabury MR, Chaparzadeh N. 2007. Mycorrhizal colonization improves onion (*Allium cepa* L.) yield and water use efficiency under water deficit condition. *Scientia Horticulturae* 114: 11-15.
- Bolay PA. 2005. Les oïdiums de Suisse (Erysiphacées). *Cryptogamica Helvetica* 20: 1–176.
- Boller T et Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379–406.
- Bolwell GP, Wojtaszek P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 51: 347–366.
- Bonfante P, Genre A. 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary developmental perspective. *Trends in plant science* 13: 492–498.
- Bonfante P, Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 1: 48.
- Bonfante P, Peroto S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3–21.
- Bonfante P, Requena N. 2011. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 451–457.
- Both M, Csukai M, Stumpf MPH and Spanu PD. 2005. Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen. *The Plant Cell* 17: 2107–2122.
- Boudet AM. 2000. Lignins and Lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 81–96.
- Boulenouar N, Marouf A, Cherit A. 2011. Phytopathologie fongique et metabolites secondaires. *Annales de l'Université de Bechar* 11: 1112–6604.
- Breuillin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P. 2010. Phosphate systemically inhibits development of arbuscularmycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal* 64: 1002–1017.
- Breuninger M, Trujillo CG, Serrano E, Fischer R, Requena N. 2004. Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41: 542–552.
- Briceño-Felix G, Huerta-Espino J, Torres i Ruiz L, Betbese JA, Martín Sánchez JA. 2008. Yield losses caused by powdery mildew on bread wheat cultivars under irrigated Mediterranean conditions in Spain. In: Molina-Cano JL, Christou P, Graner A, Hammer K, Jouve N, Keller B, Lasa JM, Powell W, Royo C, Shewry P, Stanca

AM, eds. *Cereal science and technology for feeding ten billion people: genomics era and beyond*. Zaragoza, Spain: CIHEAM / IRTA, 183–185.

- Brill EM, Abrahams S, Hayes CM, Jenkins CLD, Watson JM. 1999. Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol Biol* 41: 279–291.
- Brundrett MC. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320: 37–77.
- Bucciarelli B, Jung HG, Ostry ME, Anderson NA, Vane CP. 1998. Wound response characteristics as related to phenylpropanoid enzyme activity and lignin deposition in resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). *Can. J. Bot* 76: 1282–1289.
- Buchenauer H, Hellwald KH (1985) Resistance of *Erysiphe graminis* on barley and wheat to sterol C-14-demethylation inhibitors. *EPPO Bulletin* 15: 459–66.
- Bucking H, Shachar-Hill Y. 2005. Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* 165: 899–912.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular plant-microbe interactions* 13: 693–698.
- Bunn R, Lekberg Y, Zabinski C. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi ameliorate temperature stress in thermophilic plants. *Ecology* 90: 1378–1388.
- Burrows BL, Ahmad I. 2007. Fungicide seed treatments minimally affect arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonisation of selected vegetable crops. *Journal of Biological Sciences* 7: 417–420.

C

- Calonne M, Fontaine J, Debiane D, Laruelle F, Grandmougin-ferjani A, Sahraoui AL. 2010. Propiconazole Toxicity on the Non-Target Organism, the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus irregulare*, in: Carisse, O. (Eds.), *Fungicides*, InTech Europe. pp. 23-39.
- Calonne M, Sahraoui AL-H, Campagnac E, Debiane D, Laruelle F, Grandmougin-Ferjani A, Fontaine J. 2012. Propiconazole inhibits the sterol 14 α -demethylase in *Glomus irregulare* like in phytopathogenic fungi. *Chemosphere* 87: 376–383.
- Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM, Ton J. 2014. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci* 18: 539–545.
- Campagnac E, Lounès-Hadj Sahraoui A, Debiane D, Fontaine J, Laruelle F, Garçon G, Verdin A, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A. 2010. Arbuscular mycorrhiza partially protects chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* 20: 167–178.
- Campagnac E, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A, Laruelle, F, Durand R, Grandmougin-Ferjani A. 2009. Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 19: 365–374.
- Campagnac E, Lounès-Hadj Sahraoui A, Debiane D, Fontaine J, Laruelle F, Garçon G, Verdin A, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A. 2010. Arbuscular mycorrhiza partially protect chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* 20: 167–178.
- Campagnac E, Fontaine J, Sahraoui AL-H, Laruelle F, Durand R, Grandmougin-Ferjani A. 2008. Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry* 69: 2912–2919.
- Campbell MM, Ellis BE. 1992. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. III. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Physiology* 98: 62–70.
- Campos-Soriano, García-Martínez J, San Segundo B. 2012. The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defense-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular plant pathology* 10: 1364–3703.
- Cargnello M, Roux PP. 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 50–83.

- Caron M, Fortin JA, Richard C. 1986. Effect of inoculation sequence on the interaction between *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes. *Can J Plant Pathol* 8: 12–16
- Carver TLW, Bushnell WR. 1983. The probable role of primary germ tubes in water uptake before infection by *Erysiphe graminis*. *Physiology. Plant Pathology* 23: 229–240.
- Carver TLW, Ingerson SM, Thomas BJ. 1996. Influence of host surface features on development of *Erysiphe graminis* and *Erysiphe pisi*. In: Plant cuticles – an integrated functional approach. Kierstens, G (eds) *Bios Scientific Publishers, Oxford* pp. 255–266.
- Carver TLW, Ingerson-Morris SM, Thomas BJ, Gay AP. 1994. Light-mediated delay of primary haustorium formation by *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 45: 59–79.
- Carver TLW, Robbins MP, Zeyen RJ. 1991. Effects of two PAL inhibitors on the susceptibility and localized autofluorescent host cell responses of oat leaves attacked by *Erysiphe graminis* DC. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 269–287.
- Castellanos-Morales V, Cárdenas-Navarro R, García-Garrido JM, Illana A, Ocampo JA, Steinkellner S, Vierheilig H. 2012. Bioprotection against *Gaeumannomyces graminis* in barley– a comparison between arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil Environ* 58: 256–261.
- Caulet N. 2009. Parois secondaires et lignifications chez *Arabidopsis thaliana*. In: www.biochimie.univ-paris7.fr.
- Cawood ME, Pretorius JC, Visser B, van der Westhuizen AJ. 2013. Induced gene expression in wheat seedlings treated with a crude extract of *Agapanthus africanus* L. prior to leaf rust infection. *African journal of biotechnology* 12: 2876 – 2883.
- Caylak E, Tokar M. 2012. Metallic and microbial contaminants in drinking water of Cankiri, Turkey. *E-Journal of Chemistry* 9: 608–614.
- Chan Z. 2013. Proteomic responses of fruits to environmental stresses. *Front Plant Sci* 3: 311.
- Chandanie WA, Kubota M, Hyakumachi M. 2006. Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. *Plant Soil* 286: 209–217.
- Chandra S, Heinsteins PF, Low PS. 1996. Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol* 110: 979–986.
- Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A, Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Jouddrier P, Gautier MF, Catollico L, Beckert M, Aubourg S, Weissenbach J, Cabouche M, Bernard M, Leroy P, Chalhou B. 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17: 1033–1045.
- Chatzistathis T, Orfanoudakis M, Alifragis D, Therios. I. 2013. Colonization of Greek olive cultivars' root system by arbuscular mycorrhiza fungus. *Scientia Agricola* 70: 185–194.
- Chaure P, Spanu P, Gurr SJ. 2002. In Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TW (Eds). DNA-mediated transformation of *Blumeria graminis* f. sp. *hordie*. The powdery mildew. A comprehensive treatise. Minnesota. *The American Phytopathological Society Press* 9: 134–145.
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sánchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DF. 1995. Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4134–4137.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883–1886.
- Cheng Y, Ma W, Li X, Miao W, Zheng L, Cheng B. 2012. Polyamines stimulate hyphal branching and infection in the early stage of *Glomus etunicatum* colonization. *World journal of microbiology & biotechnology* 28: 1615–1621.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814.
- Choi HW, Kim YJ, Lee SC, Hong JK, Hwang BK. 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase *capo2* activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology* 145: 890–904.

- Choi HW, Lee DH, Hwang BK. 2009. The pepper calmodulin gene CaCaM1 is involved in reactive oxygen species and nitric oxide generation required for cell death and the defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1389–1400.
- Christensen AB, Cho BH, Næsby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, Collinge DB and Thordal-Christensen H. 2002. The molecular characterisation of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* 3: 135–144.
- Clarke JM, McCaig TN, DePauw RM, Knox RE, Ames NP, Clarke FR, Fernandez MR, Marchylo BA, Dexter JE. 2005. « Commander Durum Wheat » *Can. J. Plant Sci.* Revue canadienne de phytotechnie 85: 901–904.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Ramussen U, and Vad K. 1993. Plant chitinases. *Plant J.* 3: 31–40.
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qui JL, Huckelhoven R, Stein M, Freialdenoven A, Somerville SC, and Schulze-Lefert P (2003) Snare-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425: 973–007.
- Constant N. 2008. Analyse des stratégies de lutte contre l'oïdium des viticulteurs biologiques en Languedoc-Roussillon – Synthèse d'enquêtes. 14 p.
- Cordelier S, de Ruffray P, Fritig B, Kauffmann S. 2003. Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Mol. Biol* 51: 109–118.
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus *Mol. Plant-Microbe Interact* 11: 1017–1028.
- Cozzolino V, Pigna M, Di Meo V, Caporale AG, Violante A. 2010. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus supply on the growth of *Lactuca sativa* L. and arsenic and phosphorus availability in an arsenic polluted soil under non-sterile conditions. *Applied Soil Ecology* 45: 262–268.
- Croft KPC, Voisey CR, Slusarenko AJ. 1990. Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 36: 49–62.

D

- Daei G, Ardekani MR, Rejali F, Teimuri S, Miransari M. 2009. Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Journal of Plant Physiology* 166: 617–625.
- Dalpé Y. 2005. Mycorrhizae: a potential tool for plant protection but not a panacea. *Phytoprotection* 86: 53–59.
- Das MK, Griffey CA. 1995. Gene action for adult-plant resistance to powdery mildew in wheat. *Genome* 38: 277–282.
- David R, Itzhaki H, Ginzberg I, Gafni Y, Galili G, Kapulnik Y. 1998. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 489–497.
- Davis RM, Menge JA, Erwin DC. 1979. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on Verticillium wilt of cotton. *Phytopathology* 69: 453–456.
- Davletova S, Rizhsky L, Liang, H, Shenggiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R. 2005. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 268–281.
- De La Noval B, Perez E, Martinez B, Leon O, Martinez-Gallardo N, Delano-Frier J. 2007. Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza* 17: 449–460.
- De La Peña E, Echeverría SR, Van Der Putten WH, Freitas H, Moens M. 2006. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytol* 169: 829–840.
- De Meyer G, Capieau K, Audenaert K, Buchala A, M'etraux J-P, H' ofte M. 1999. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant-Microbe Interact* 12: 450–58.

- De Meyer G, Höfte M. 1997. Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. *Phytopathology* 87: 588–593.
- De Torres Zabala M, Bennett MH, Truman WH, Grant MR. 2009. Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host–pathogen conflict and moulds plant defence responses. *Plant J.* 59: 375–386.
- De Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bögre L, Grant M. 2007. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J.* 26: 1434–1443.
- Dean JD, Goodwin PH, Hisang T. 2005. Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colloetotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *Journal of Experimental Botany* 56: 1525–1533.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Ferjani A, Shirali P, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ. Exp. Bot* 64: 120–127.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* 70: 1421–1427.
- Delos M, Lochon S, Murer F, Pillon O, Vergnaud A, Clochon J. 1998. Bilan phytosanitaire de la campagne 1996/1997. *Phytoma* 501: 18–21.
- Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact* 10: 716–24.
- Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X, Wang S. 2008. Activation of the indole-3-acetic acid amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *PlantCell* 20: 228–240.
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: reviews 3004.1–3004.10.
- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in plant science* 17: 413–422.
- Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL and Simmonds DH. 2001. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 297–307.
- Dong X. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol* 7: 547–52.
- Dore I, Legrand M, Cornelissen BJC, Bol JF. 1991. Subcellular localization of acidic and basic PR proteins in tobacco mosaic virus-infected tobacco. *Archives of Virology* 120: 97–107.
- Douds DD, Galvez L, Bécard G, Kapulnik Y. 1998. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytologist* 138: 27–35.
- Douds DD Jr, Galvez L, Janke RR, Wagoner P. 1995. Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agric Ecosyst Environ* 52:111–118.
- Douds DD, Janke RR, Peters SE. 1993. VAM fungus spore populations and colonization of roots of maize and soybean under conventional and low-input sustainable agriculture. *Agric. Ecosys. Environ.* 43: 325–335.
- Droillard MJ, Boudsoq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C. 2004. Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Lett* 574: 42–48.
- Dudler R, Hertig C, Rebmann G, Bull J, Mauch F. 1991. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 14–18.
- Dugassa GD, Von Alten H, Schönbeck. 1996. Effect of arbuscular mycorrhiza on health of *linium usitatissimum* L. infected by fungal pathogen. *Plant and soil* 185: 173 – 182.
- Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2000. Modulation of host defence systems. In: Kapulnik Y, Douds DDJ (eds) *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer, The Netherlands, pp 173–200.
- Duponnois R, Plenchette C, Thioulouse J et Cadet P. 2001. The mycorrhizal soil infectivity and arbuscular mycorrhizal fungal spores communities in soils of different aged fallows in Senegal. *Applied Soil Ecology* 17: 239-251.

- Durrant WE, et Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185–209.

E

- Eberhardt TL, Bernard MA, He L, Davin LB, Wooten JB, Lewis NG. 1993. Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda*. *In situ* characterization of a gymnosperm lignin. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 21088-21096.
- Edmunds B, Pottorff LP. 2012. Powdery Mildews. Colorado State University Extension no. 2.902. <http://www.ext.colostate.edu/pubs/garden/02902.html>.
- Edwards R, Dixon D, Walbot B. 2000. Plant glutathione S-transferases enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 193–198.
- Ellis JR, Roder W, Mason SC. 1992. Grain sorghum-soybean rotation and fertilization influence in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56:789-794.
- Elsen A, Gervacio D, Swennen R, De Waele D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18: 251–256.
- Epstein L, Nicholson RL. 1997. Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces In: Carroll G, Tudzynski P (eds) *The Mycota*, vol V. Plant relationships, part A. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 11–25.

F

- Faster T, Hause G. 2005. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*. 15: 373–379.
- Feldmann F, Boyle C. 1998. Concurrent development of arbuscular mycorrhizal colonization and powdery mildew infection on three *Begonia hiemalis* cultivars. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz. Journal of plant diseases and protection* 105: 121–129.
- Feng DX, Tasset C, Hanemian M, Barlet X, Hu J, Trémousaygue D, Deslandes L, Marco Y. 2012. Biological control of bacterial wilt in *Arabidopsis thaliana* involves abscisic acid signalling. *NewPhytol* 194: 1035–1045.
- Feng G, Zhang X, Li X, Tian C, Tang C, Rengel Z. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12: 185–190.
- Fernández, Merlos M, López-Ráez JA, Martínez-Medina A, Ferrol N, Azcón C, Bonfante P, Flors V, Pozo MJ (2014) Defense Related Phytohormones Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbioses Depends on the Partner Genotypes. *J Chem Ecol* 40: 791–803.
- Ferrol N, González-Guerrero M, Valderas A, Benabdellah, K, Azcón-Aguilar C. 2009. Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochem. Rev* 8: 551–559.
- Feussner I, Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53: 275–297.
- Fiorilli V, Catoni M, Francia D, Cardinale F, Lanfranco L. 2011. The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* 93: 237–242.
- Fitter AH. 2006. What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist* 172: 3–6.
- Francis SA, Dewey FM, Gurr SJ. 1996. The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 47: 201–211.
- Fraústro Da Silva JJR, Williams RJP. 2001. *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. Oxford: Clarendon Press.
- Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjaer MF, Thordal-Christensen H, Pons-Kuehnemann J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16: 413–419.

G

- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754–756.
- Galet P. 1999 : Précis de pathologie viticole. P.7–19.
- Gallou A, Mosquera HPL, Cranenbrouck S, Suárez JP, Declerck S. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76: 20–26.

- Gao Y, Liu X, Stebbing JA, He D, Laroche A, Gaudet D, Xing T. 2011. *TaFLRS*, a novel mitogen-activated protein kinase in wheat defence responses. *European Journal of Plant Pathology* 131: 643–651.
- García Garrido JM, Ocampo JA. 1988. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol* 110: 551–555.
- García-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 711–724.
- García-Garrido JM, Ocampo JA. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of experimental botany* 5: 1377–1386
- García-Andrade J, Ramirez V, Flors V, Vera P. 2011. *Arabidopsis ocp3* mutant reveals a mechanism linking ABA and JA to pathogen-induced callose deposition. *Plant J* 67: 783–794.
- Garmendia I, Goicoechea N, Aguirolea J. 2004. Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against verticillium wilt. *Biol. Contr* 31: 296–305.
- Gaude N, Nakamura Y, Scheible WR, Ohta H, Dormann P. 2008. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 56: 28–39.
- Genre A, Bonfante P, Vegetale B, Torino U, Mattioli IV. 2007. Check-In Procedures for Plant Cell Entry by Biotrophic Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 20: 1023–1030.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant cell* 20: 1407–1420.
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* 17: 3489–3499.
- Gernns H, von Alten H, Poehling HM. 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11: 237–243.
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Dexheimer J. 1979. Enzymatic Studies on the Metabolism of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza. Iii. Ultrastructural Localization of Acid and Alkaline Phosphatase in Onion Roots Infected By *Glomus Mosseae* (Nicol. & Gerd.). *New Phytologist* 82: 127–132.
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519–30
- Gianinazzi S, Martin C, Vallée JC. 1970. Hypersensibilité au virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Paris* 270: 2383–2386.
- Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 1978. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiological Plant Pathology* 12: 45–53.
- Gilbert N. 2009. Environment: the disappearing nutrient. *Nature* 461: 716–718.
- Giovannetti M, Sbrana C. 1998. Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza* 8 :123–130.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citerinesi AS, Logi C. 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol* 125: 587–593.
- Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* – 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301–308.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205–227.
- Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113:17-35.
- Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V, Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Gianinazzi S. 1993. Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a ‘locus a’ mutant *Pisum sativum* L. *Planta* 191: 112–122.

- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, Torres-Jerez I, Tang Y, Balcaflor EB, Udvardi MK, Harrison MJ. 2009. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BioMed Central Plant Biology* 9: 10. 19p.
- González-Guerrero M, Melville LH, Ferrol N, Lott JNA, Azcón-Aguilar C, Peterson RL. 2008. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 103–110.
- Görg R, Hollricher K, Schulze-Lefert P. 1993. Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *The Plant Journal* 3: 857–866.
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629–643.
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature Letters* 435: 819–823.
- Graham JH. 2000. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. In: Podila GK, DoudsDD (eds) *Current advances in mycorrhizae research*. Minnesota, USA: APS Press 127–140.
- Grandison GS, Cooper KM (1986) Interaction of Vesicular-ArbuscularMycorrhizae and Cultivars of Alfalfa Susceptible and Resistant to *Meloidogyne hapla*. *Journal of Nematology* 18: 141-149.
- Grant C, Bittman S, Montrea M, Plenchette C, Morel C (2004) Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Can. J. Plant Sci* 85: 3–14.
- Grant JJ, Loake GJ. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21–29.
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J. 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* 23: 441–450.
- Green JR, Carver TLW, Gurr SJ. 2002. The formation and function of infection and feeding structures. In: Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW (eds) *The Powdery Mildews. A comprehensive Treatise*. American Phytopathological Society, Minnesota USA, 66–82.
- Guest D, Brown J. 2001. Plant Defences against Pathogens. In *Plant Pathogens and Plant Diseases*; Brown JF, Ogle HJ, Eds. Rockvale Publications for the Division of Botany, Rockvale Publications for the Division of Botany, School of Rural Science and Natural Resources, University of New England: Armidale New South Wales, New England, UK, 1997. 15. Dangl JL, Jones JDG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 441: 826–833.
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, He J, Udvardi MK, BonfanteP. 2009b. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 182: 200–212.
- Guether M, Neuhauser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P. 2009a. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 150: 73–83.
- Gundlach H, Müller M J, Kutchan T M, Zenk M H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 15: 2389–2393.
- Gutjahr C, Paszkowski U. 2009. Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root–biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 763–772.

H

- Habibzadeh Y. 2015. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus levels on dry matter production and root traits in cucumber (*cucumis sativus* L.). *African Journal of Environmental Science and Technology* 9: 65–70.
- Habte M, Zhang YC, Schmitt, DP. 1999. Effectiveness of *Glomus* species in protecting white clover against nematode damage. *Canadian Journal of Botany* 77: 135–139.
- Hamel C. 1996. Prospects and problems pertaining to the management of arbuscular mycorrhizae in agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60: 197–210.

- Hammer EC, Nasr H, Pallon J, Olsson PA, Wallander H. 2011. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. *Mycorrhiza* 21: 117–129.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791.
- Hao Z, Fayolle L, van Tuinen D, Chatagnier O, Li X, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2012. Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema* index involves priming of defence gene responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 63: 3657–3672.
- Harrier LA, Watson CA. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manage Sci* 60: 149–157.
- Harrison M, Dixon R. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 6: 643–659.
- Harrison M, Dixon R. 1994. Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *The Plant Journal* 6: 9–20.
- Harrison MJ, Van Buuren ML. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626–629.
- Hassan S, Mathesius U. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of experimental botany* 63: 3429–3444.
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D. 2002. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* 130: 1213–1220.
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D. 2007. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochem* 68: 101–110.
- Hause B, Schaarschmidt S. 2009. The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry* 70: 1589–1599.
- Hawkins HJ, Johansen A, George E. 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226: 275–285.
- Hayek S, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Franken P. 2014. Elucidating mechanisms of mycorrhiza-induced resistance against *Thielaviopsis basicola* via targeted transcript analysis of *Petunia* hybrid genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 88: 67–76.
- Heaney SP, Hall AA, Davies SA, Olaya G (2000) Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. Proceedings of the British Crop Protection Conference: Pests and Diseases 2000. Farnham, Surrey, UK: British Crop Protection Council 755–62.
- Heath MC, Skalamera D. 1997. Cellular interactions between plants and biotrophic fungal parasites. *Adv Bot Res* 24: 195–225.
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N. 2011. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant cell* 23: 3812–23.
- Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo JA, Garcia-Garrido JM. 2007. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 175: 554–564.
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS. 1993. Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties and ancestors: a synthesis,” *Canadian Journal of Botany* 71, pp. 512–518.
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS. 1992. Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. *Can J Bot* 70:2032–2040.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139–146.
- Hoagland DR, Arnon DI 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station, Circular* 347.
- Hoffland E, Pieterse CMJ, Bik L, Van Pelt JA. 1995. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 46: 309–20.

- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G. 2003. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133: 170–181.
- Hu X, Reddy ASN. 1997. Cloning and expression of a PR-5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology* 34: 949–959.
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel KH. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251–1260.

I

- Ivanov S, Miteva L, Alexieva V, Karjin H, Karanov E. 2005. Alterations in some oxidative parameters in susceptible and resistant wheat plants infected with *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *J Plant Physiol* 162: 275–279.

J

- Jabs T, M, Christiane C, Hahlbrock K, Dierk Scheel D. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *PNAS* 94: 4800–4805.
- Jaizme-Vega MC, Rodriguez-Romero AS, Núñez LAB. 2006. Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Fruits* 61: 151–162.
- Jakobsen I. 1995. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 297–324.
- Jalali BL, Sharma OP. 1993. Biocides and non-target microorganisms: an environmental assessment. *Indian J Microbiol* 33: 83–92.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison, MJ. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1720–1725.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* 30: 310–322.
- Johansen A, Finlay RD, Olsson PA. 1996. Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 133: 705–712.
- Joner EJ, Leyval C. 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10: 155–159.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Jorgensen LN. 2010. Promouvoir l'utilisation de cultivars résistants afin de réduire l'utilisation des fongicides dans la culture du blé, De la Théorie à la Pratique Étude de Cas sur le Blé – Guide Numéro 1.
- Jung SC, García-Andrade J, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Pozo MJ. 2009. Arbuscular mycorrhiza confers systemic resistance against *Botrytis cinerea* in tomato through priming of JA-dependent defense responses. In: Mauch-Mani B, Schmidt A (eds) *Induced resistance: chances and limits*, IOBC/wprs Bulletin, Working Group “Induced resistance in plants against insects and diseases.” Proceedings of the meeting at Granada (Spain) 8–16.
- Jung SC, Martínez-Medina A, López-Raéz JA, Pozo MJ. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J. Chem. Ecol* 38: 651–64.

K

- Kabir Z. 2005. Tillage or no-tillage: impact on mycorrhizae. *Can J Plant Sci* 85: 23–29.
- Kachroo A, Kachroo P. 2007. Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling. *Genet Eng (N Y)* 28: 55–83.
- Kachroo A, Robin GP. 2013. Systemic signaling during plant defense. *Current Opinions in Plant Biology* 16: 527–533.

- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasmamembranereceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11086–11091.
- Kapoor R. 2008. Induced resistance in mycorrhizal tomato is correlated to concentration of jasmonic acid. *On Line J Biol Sci* 8:49–56.
- Kapulnik Y, Volpin H, Itzhaki H, Ganon D, Galili S, David R, Shaul O, Elad Y, Chet I, Okon, Y. 1996. Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytologist* 133: 59–64.
- Karagiannidis N, Bletsos F, Stavropoulos N. 2002. Effect of verticillium wilt (*Verticillium dahliae* kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Sci Hort* 94: 145–156.
- Kasprzewska A. 2003. Plant chitinases—regulation and function. *Cell and Molecular Biology Letters* 8: 809–824.
- Kauffman S, Dorey S, Fritig B. 2001. Les stratégies de défenses. *Pour la Science*: 116–121.
- Kazan K, Manners JM. 2009. Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 14: 373–382.
- Khalil S, Loynachan TE, Tabatabai AM (1999) “Plant determinantsof mycorrhizal dependency in soybean,” *Agronomy Journal* 91: 135–141.
- Khalvati MA, Hu Y, Mozafar A, Schmidhalter U. 2005. Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. *Plant biology* 7: 706–712.
- Khaosaad T, García-Garrido JM, Steinkellner S, Vierheilig H. 2007. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol Biochem* 39: 727–734.
- Khaosaad T, Vierheilig H, Nell M, Zitterl-Eglseer K, Novak J. 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16: 443–446.
- Kieffer M, Neve J, Kepinski S. 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 12–20
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah J a, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk G A, Hart MM, Bago A. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880–882.
- Klop Holz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus irregularis* promotes symbiotic biotrophy. *Current biology: CB* 21: 1204–1209.
- Knoester M, Pieterse CMJ, Bol JF, Van Loon LC. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant-Microbe Interact* 12: 720–27.
- Koga H, Bushnell WR, Zeyen RJ. 1990. Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp *hordei*. *Can. J. Bot.* 68: 2344–2352.
- Kombrink E, Schmelzer E. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107: 69–78.
- Koske R.E. 1981. *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia* 73: 288–300.
- Kotchoni SO. 2004. Molecular and physiological characterization of transgenic *Arabidopsis* plants expressing different aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) genes, Ph.D. thesis, University of Bonn, Germany
- Kothari SK, Marschner H, George E. 1990. Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytologist* 116: 303–311.
- Kovács V, Pál M, Vida G, Szalai G, Janda T. 2011. Effect of powdery mildew infection on the antioxidant enzyme activities in different lines of Thatcher-based wheat. *Acta Biologica Szegediensis.* 55: 99–100.
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wastanack C. 2000. Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the “oxylipin signature” in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* 13: 177–187.

- Krishna KR, Bagyaraj DJ. 1984. Growth and nutrient uptake of peanut inoculated with the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* compared with non-inoculated ones. *Plant and Soil* 77: 405–408.
- Kruger WM, Szabo LJ, Zeyen RJ. 2003. Transcription of the defense response genes chitinase IIb, PAL and peroxidase is induced by the barley powdery mildew fungus and is only indirectly modulated by R genes. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 63: 167–168.
- Kumar S, Sharma AK, Rawat SS, Jain DK, Ghosh S. 2013. Use of pesticides in agriculture and livestock animals and its impact on environment of India. *Asian J. Environ. Sci* 8: 51–57.
- Kunoh H, Aist JR, Israel HW. 1979. Primary germ tubes and host cells penetrations from appressoria of *Erysiphe graminis hordei*. *Ann Phytopathol Soc Japan* 45: 326–332.
- Kunoh H, Nicholson RL, Yoshioka H, Yamaoka N, Kobayashi I. 1990. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*: Degradation of the host cuticle. *Physiol. MOI. Plant Patho.* 36 : 397–407.
- Kuo CG, Haung RS. 1982. Effect of vesicular arbuscular mycorrhizae on the growth and yield of rice stubble cultured soybeans. *Plant and Soil* 64: 325.

L

- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T. 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews* 198: 267–284.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M and Rothstein S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 7542–7546.
- Lamb C, Dixon R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275.
- Lambais MR, Mehdy MC. 1993. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 6: 75–83.
- Lambais MR, Mehdy MC. 1998. Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. *New Phytologist* 140: 33–42.
- Lambais MR. 2000. Regulation of plant defence-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podila GK, Douds DD, eds. Current advances in mycorrhizae research. Minnesota, USA: *The American Phytopathological Society* 45–59.
- Lane BG. 2002. Oxalate, Germins, Higher-Plant Pathogens. *IUBMB Life* 53: 67–75.
- Lanfranco L, Novero M, Bonfante P. 2005. The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts. *Plant Physiol* 137: 1319–1330.
- Larsen J, Yohalem D. 2004. Interactions between mycorrhiza and powdery mildew of cucumber. *Mycological Progress* 3: 123–128.
- Lazcano C, Barrios-Masias FH, Jackson LE. 2014. Arbuscular mycorrhizal effects on plant water relations and soilgreenhouse gas emissions under changing moisture regimes. *So Soil Biology & Biochemistry* 74: 184–192.
- Le Grusse P, Mandart E, Ayadi H, Fabre J. 2012. L'Indicateur de Risque de Toxicité Humaine (IRTH). Colloque Phyto – Santé, Tous concernés.
- Le Souder C, Mazieres C, Rodes V. 1998. La fertilisation minérale sur le blé: des pratiques régionales diversifiées. *Agreste – Les Cahiers* 30: 31–38
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A. 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *NewPhytol* 171: 249–269.
- Lee A, Cho K, Jang S, Rakwal R, Iwahashi H, Agrawal GK, Shim J, Han O. 2004. Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 734–8.
- Lee CS, Lee YJ, Jeun YC. 2005. Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathology Journal* 21: 237–243.
- Lee SC, Hwang BK. 2005. Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta* 221: 790–800.

- Leeman M, van Pelt JA, den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B. 1995. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85: 1021–1027.
- Lepoivre P. 2003. Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondement de stratégies de lutte. De Boeck Université, Les presses agronomiques de Gembloux, Bruxelles, 432p.
- Leroux P. 2004. Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control (Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 195–222.
- Le Tacon F, T. Le Tacon V, Mauron Y, Rousseau M, Backer and D. Bouchard, 1999. Fertilisation raisonnée et mycorhize. 4^{ème} rencontre de la fertilisation raisonnée. Blois, novembre-décembre 1999, pp 211-222.
- Leubner-Metzger G, Meins FJ. 1999. Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* 49–76.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593.
- Li AL, Wang ML, Zhou RH, Kong XY, Huo NX, Wang WS, Zia JZ. 2005. Comparative analysis of H₂O₂ accumulation in compatible and incompatible wheat powdery mildew interaction. *Plant Pathology* 54: 308–316.
- Li H, Wei G, Xu J, Huang L, Kang Z. 2011. Identification of wheat proteins with altered expression levels in leaves infected by the stripe rust pathogen. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 2423–2435.
- Li HE, Fischer R, Liao YC. 2001. Molecular evidence for induction of phenylalanine ammonia-lyase during *Puccinia graminis* infection and elicitation in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 286–291.
- Li HY, Yang GD, Shu HR, Yang YT, Ye BX, Nishida I, Zheng CC. 2006. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. *Plant and Cell Physiology* 47: 154–163.
- Li HY, Yang GD., Shu HR, Yang YT, Ye BX, Nishida I, Zheng CC. 2006. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. *Plant Cell Physiol* 47:154–163.
- Li T Lin G Zhang X Chen YL Zhang SB Chen BD. 2014. Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-014-0578-3>.
- Li Y, Liu Z, Hou H, Lei H, Zhu X, Li X, He X, Tian C. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi-enhance resistance against *Phytophthora sojae* infection on soybean leaves is mediated by a network involving hydrogen peroxide, jasmonic acid, and the metabolism of carbon and nitrogen. *Acta Physiol Plant* 35: 3465–3475.
- Liang H, Maynard CA, Allen RD, Powell WA. 2001. Increased *Septoria musiva* resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Mol. Biol* 45: 619–629.
- Lieberherr DU, Wagner P, Dubuis J, Metraux F, Mauch. 2003. The rapid induction of glutathione S-transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas syringae* is the result of combined salicylic acid and ethylene signaling. *Plant Cell Physiol* 44, pp. 750–757.
- Lingua G, D'Agostino G, Massa N, Antosiano M, Berta G. 2002. Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza* 12: 191–198.
- Liu A, Hamel C, Hamilton RI, Ma BL, Smith DL. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* 9: 331–336.
- Liu G, Hu X, Sun B, Yang T, Shi J, Zhang L, Zhao Y. 2013. Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through MAPK-STAT1. *Blood* 121: 519–529.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant Journal* 50: 529–544.

- López-Pedrosa A, González-guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. 2006. *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 102–110.
- López-Ráez JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, Pozo MJ. 2010. Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *J Exp Bot* 61: 2589–2601.
- Lorito M, Broadway RM, Hayes CK, Woo SL, Noviello C, Williams DL, Harman GE. 1994. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 525–527.
- Low PS, Merida JR. 1996. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* 96: 533–542.
- Lowry OH, Rosebroughi NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lupu R, Grossman S, Cohen Y. 1980. The involvement of lipoxygenase and antioxidants in pathogenesis of powdery mildew on tobacco plants. *Physiol Plant Pathol* 16: 241–248.
- Lynch JP, Lauchli A, Epstein E. 1991. Vegetative growth of the common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Science* 31: 380–387.

M

- Maathuis FJM. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 250–258.
- Maeda D, Ashida K, Iguchi K, Chechetka SA, Hijikata A, Okusako Y, et al. 2006. Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. *Plant Cell Physiol* 47: 807–817.
- Maffei G, Miozzi L, Fiorilli V, Novero M, Lanfranco L, Accotto GP. 2014. The arbuscular mycorrhizal symbiosis attenuates symptom severity and reduces virus concentration in tomato infected by *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV). *Mycorrhiza* 24: 179–186.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J. 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58–63.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Samuel T, Noble R, Parkway SN. 2001. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus irregularis* regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1140–1148.
- Manners JM, Gay JL. 1982. Transport, translocation and metabolism of ¹⁴C-photosynthates at the host-parasite interface of *Pisum sativum* and *Erysiphe pisi*. *New phytologist* 91: 221–244.
- Manners JM, Gay JL. 1983. The host-parasite interface and nutrient transfer in biotrophic parasitism. In: *Biochemical plant pathology*, pp. 163-195, Callow JA, ed. John Wiley, Chichester.
- Mark GL, Cassells AC. 1996. Genotype-dependence in the interaction between *Glomus fistulosum*, *Phytophthora fragariae* and the wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Soil* 185: 233–239.
- Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition in Higher Plants*. Academic Press, London, RU.
- Martinez C, Blanc F, Le Claire E, Besnard O, Nicole M, Baccou JC. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heatdenatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol* 127: 334–344.
- Marulanda A, Azcón R, Ruiz-Lozano JM. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119: 526–533.
- Marzluf GA. 1996. Regulation of nitrogen metabolism in mycelial fungi. In: *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*, pp: 357.
- Matsubara Y, Tamura H, Harada T. 1995. Growth enhancement and *Verticillium* wilt control by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculation in eggplant. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64: 555–561.
- McDonald BA, Linde C. 2002. Pathogens population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Ann Rev Phytopathol* 40: 349–379.

- Mcgonigle TP, Miller MH. 2000. The inconsistent effect of soil disturbance on colonisation of roots of arbuscular mycorrhizal fungi: a test of the inoculum density hypothesis. *Applied soil ecology* 14: 147–155.
- Mcgonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. 1990. A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495–501.
- Meixner C, Ludwig-Muller J, Miersch O, Gresshoff P, Staehelin C, Vierheilig H. 2005. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. *Planta* 222:709–715.
- Mellersh DG, Foulds IV, Higgins VJ and Heath MC. 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *The Plant Journal* 29: 257–268.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980.
- Mengiste T. 2012. Plant Immunity to Necrotrophs. *Annu. Rev. Phytopatho* 150: 267–294.
- Menéndez AB, Scervino JM, Godeas AM. 2001. Arbuscular mycorrhizal populations associated with natural and cultivated vegetation on a site of Buenos Aires province, Argentina. *Biol Fertil Soils* 33:373–381.
- Meynard JM, Jeuffroy MH. 2002. Progrès génétique et agriculture durable. *Le Sélectionneur Français* 53: 69–82.
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD. 1995. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103: 17–23.
- Miozzi L, Catoni M, Fiorilli V, Mullineaux PM, Accotto GP, Lanfranco L. 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis limits foliar transcriptional responses to viral infection and favors long-term virus accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1562–1572.
- Miransari M. 2010. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology* 12: 563–569
- Mitchell H J, Hall J, Barber MS. 1994. Elicitor-Induced Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Activity in Lignifying Wheat (*Triticum aestivum*) Leaves. *Plant Physiol* 104: 551–556.
- Mitsuhashi N, Ohnishi M, Sekiguchi Y, Kwon YU, Chang YT, Chung SK, Inoue Y, Reid RJ, Yagisawa H, Mimura T. 2005. Phytic acid synthesis and vacuolar accumulation in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* induced by high concentration of inorganic phosphate and cations. *Plant Physiology* 138: 1607–1614.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. The reactive oxygen gene network in plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498.
- Mohr PG, Cahill D. 2003. Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. *Funct. Plant Biol* 30: 461–469.
- Mollier A, Pellerin S. 1999. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany* 50: 487–497.
- Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM. 1989. Oxygentoxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant* 76: 456–459.
- Morkunas I, Gmerek J. 2007. The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *J Plant Physiol* 164: 185–94.
- Mostafalou S, Abdollahi M, 2012b. The role of environmental pollution of pesticides in human diabetes. *Int. J. Pharmacol* 8: 139–140.
- Mukerji KG, Ciancio A. 2007. Mycorrhizae in the integrated pest and disease management. In: Ciancio A, Mukerji KG (eds) *General concepts in integrated pest and disease management*. Springer, The Netherlands, pp 245–266.
- Mustafa G, Tisserant B, Randoux B, Fontaine J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Reignault Ph. 2014. Mechanisms involved in mycorrhizal wheat protection against powdery mildew. *Commun Agric Appl Biol Sci* 79: 403–10.
- Muthukrishnan S, Liang GH, Trick HN, Gill BS. 2001. Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell* 64: 93–114.

N

- Nagahashi G, Douds DD. 2000. Partial separation of root exudate and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research* 104: 1453–1464.

- Nair A, Kolet SP, Thulasiram HV, Bhargava S. 2015. Systemic jasmonic acid modulation in mycorrhizal tomato plants and its role in induced resistance against *Alternaria alternata*. *Plant Biology* **17**: 625–631.
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**: 339–346.
- Neuhaus JM. 1999. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Pathogenesis-related proteins in plants (Datta SK et Muthukrishnan S. eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp77–105.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 369–389.
- Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mösinger E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal - Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* **108**: 17–27.
- Nielsen KA, Nicholson RL, Carver TLW, Kunoh H, Oliver RP. 2000. First touch: An immediate response to surface recognition in conidia of *Blumeria graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* **56**: 63–70
- Nicholson RL, Kunoh H. 1995. Early interaction, adhesion and establishment of the infection court by *Erysiphe graminis*. *Can. J. Bot* **73**: 609–615.
- Nürnberger T and Scheel D. 2001. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* **6**: 372–379.
- Nürnberger T, Brunner F. 2002. Innate immunity in plants and animals: Emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol* **5**: 318–324.

O

- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP. 2012. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**: 1769–1776.
 - Oehl F, Alves da Silva G, Goto BT, Costa Maia L, Sieverding E. 2011. Glomeromycota: two new classes and a new order. *Mycotaxon* **116**: 365–379.
 - Ohta H, Shida K, Peng YL, Furusawa I, Shishiyama J, Aibara S, Morita Y. 1991. A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiology* **97**: 94–98.
- Ohtomo R, Saito M (2005) Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* **67**: 571–578.
- Öpik M, Zobel M, Cantero JJ, Davison J, Facelli JM, Hiiesalu I, Jairus T, Kalwij JM, Koorem K, Leal ME, Liira J, Metsis M, Neshataeva V, Paal J, Phosri C, Pölme S, Reier Ü, Saks Ü, Schimann H, Thiéry, O, Vasar M, Moora M. 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **23**: 411–430.
 - Oruc HH. 2010. Fungicides and Their Effects on Animals. Pages 349–362. In; Fungicides. Carisse, O (Editor). *Agricultural and Biological Sciences* 541 pp.
 - Owusu-Bennoah E, Mosse B. 1979. Plants growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza XI. Field inoculation responses in barley, lucerne and onion. *New Phytologist* **83**: 671.

P

- Pajerowska-Mukhtar KM, Emerine DK, Mukhtar MS. 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci* **18**: 402–11.
- Pál M, Kovács V, Vida G, Szalai G, Janda T. 2011. Changes in salicylic acid and polyamine contents following powdery mildew infection of near-isogenic. Thatcher-based wheat lines carrying different Lr genes. *Acta Biologica Szegediensis* **55**:139–141.
- Panon ML, Panigai L, Walker AS, Leroux P, 2006. Les nouveautés concernant la pourriture grise en quelques points. *Le Vigneron Champenois* **127**: 26–36.
- Parke JL, Kaepler SA. 2000. Effects of genetic differences among crop species and cultivars upon the arbuscular mycorrhizal symbiosis, in *ArbuscularMycorrhizas: Physiology and Function*, Y. Kapulnik and DD. Douds, Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews. Microbiology* **6**: 763–775.

- Pascholati SF, Yoshioka H, Kunoh H, Nicholson, RL. 1992. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*—cutinase is a component of the conidial exudates. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 41: 53–59.
- Paszkowski U. 2006. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 172: 35–46.
- Pauly N, Pucciariello C, Mandon K, Innocenti G, Jamet A, Baudouin E, Hérouart D, Frendo P, Puppo A. 2006. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume Rhizobium symbiosis. *J Exp Bot* 57:1769–1776.
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M. 1994. Phenylalanine ammonia lyase in tobacco. (Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor). *Plant Physiology* 106: 877–886.
- Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, Fiorilli V, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. 2011. *GintAMT2*, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 1044–1055.
- Pfeffer PE, Douds DD, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999. 674 Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 120: 587–598.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158–161.
- Pieterse CMJ, León-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308–316.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 28: 489–521.
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, VanWees SCM, Bakke PAHM. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol* 52: 347–75.
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC., Panstruga R, Schulze-Lefert P. 2002. The Barley MLO Modulator of Defense and Cell Death Is Responsive to Biotic and Abiotic Stress Stimuli. *Plant Physiol* 129: 1076-85.
- Pineda A, Zheng SJ, Van Loon JJA, Pieterse CMJ, Dicke M. 2010. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci* 15: 507–514.
- Pinochet J, Calvet C, Camprubi A, Fernandez C. 1996. Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops – A review. *Plant Soil* 185: 183–190.
- Pivato B, Gamalero E, Lemanceau P, Berta G. 2008. Colonization of adventitious roots of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12 as affected by arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiol Lett* 289: 173–180.
- Plenchette C, Clermont-Dauphin C, Meynard JM, Fortin JA. 2004. Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping system. *Canadian Journal of Plant Science* 85:31–41.
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr. Biol* 21: 1197–203.
- Polle A, Otter T, Seifert F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology* 106: 53–60.
- Porcel R, Aroca R, Cano C, Bago A, Ruiz-Lozano JM. 2006. Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a 14-3-3 protein that is up-regulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microbial Ecology* 52: 575–582.
- Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM. 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 181–200.
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55: 1743–1750.

- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM. 1998. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. *Journal of Experimental Botany* 49: 1729–1739.
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM. 1999. β -1, 3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sci* 141: 149–157.
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C. 2007. Unravelling mycorrhiza induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* 10:1–6.
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C. 2002. Localized vs systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 525 – 534.
- Pozo MJ, Jung SC, Martínez-Medina A, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C, Barea JM. 2013. Root Allies: Arbuscular Mycorrhizal Fungi Help Plants to Cope with Biotic Stresses. R. Aroca (ed) *Symbiotic Endophytes, Soil Biology* pp 37.
- Pozo MJ, Verhage A, García-Andrade J, García JM, Azcón-Aguilar C. 2009. Priming plant defense against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In: C. Azcón-Aguilar *et al.*, eds. *Mycorrhizas – Functional Processes and Ecological Impact*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 123–135.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65–74.
- Pryce-Jones E, Carver T, Gurr SJ. 1999. The role of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 55: 175–182.
- Pryce-Jones E, Carver T, Gurr SJ. 1999. The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 175–182.
- Pumplun N, Zhang X, Noar R, Harrison M. 2012. Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 665–672.

Q

- Qi Y, Liu G, Hou CY, Wang DM. 2008. The generation of H₂O₂ in wheat hypersensitive reaction induced by leaf rust fungus. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 41: 245–254.

R

- Randoux B, Renard D, Mulard G, Rossard S, Duyme F, Sanssené J, Courtois J, Durand R, Reignault P. 2010. Acetylated and non-acetylated oligogalacturonides elicit different defence responses and induce resistance in wheat against powdery mildew. *Phytopathology* 100: 1352–1363.
- Randoux B, Renard D, Nowak E, Sanssené J, Courtois J, Durand R, Reignault Ph. 2006. Inhibition of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* Germination and Partial Enhancement of Wheat Defenses by Milsana. *Phytopathology* 96: 1278–1286.
- Ratnayake M, Leonard RT, Menge JA. 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol* 81: 543–552.
- Read DJ, Perez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems — a journey towards relevance? *New Phytol* 157: 475–492.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920–1921.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB, Walker C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515–531.
- Reignault P, Cogan A, Muchembled J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Durand R, Sancholle M. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist* 149: 519–529.
- Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, Farcy F, Durand R, Reignault P. 2007. Iodine, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defense targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68: 1156–1164.
- Rengel Z. 2002. Breeding for better symbiosis. *Plant Soil* 245: 147–162. Rohyadi A, Smith FA, Murray RS, Smith SE (2004). Effects of pH on mycorrhizal colonisation and nutrient uptake in cowpea under conditions

that minimise confounding effects of elevated available aluminium. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. *Plant Soil* 260 (1/2):283-290.

- Repetto O, Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Berta G, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 2003. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New phytologist* 157: 555–567.
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68: 33–40.
- Ride JP, Barber MS. 1987. The effects of various treatments on induced lignifications and the resistance of wheat fungi. *Physiol.Mol. Plant Pathol* 31: 349–360.
- Riedel T, Groten K, Baldwin IT. 2008. Symbiosis between *Nicotiana attenuata* and *Glomus intraradices*: ethylene plays a role, jasmonic acid does not. *Plant, Cell and Environment* 31:1203–1213.
- Rillig, MC. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can J. Soil Sci.* 84: 355- 363.
- Ritter L, Goushleff NCI, Arbuckle T, Cole D, Raizenne M. 2006. Addressing the linkage between exposure to pesticides and human health effects – Research trends and priorities for research. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews* 9: 441–456.
- Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belinov AA, Gianinazzi S, Strasser RJ, Gianinazzi-Pearson V. 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1177–1185.
- Rivera-Becerril F, Metwally A, MartinLaurent F, Van Tuinen D, Dietz KJ, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2005. Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum sativum* L. *Water, air & soil pollution* 168: 171–186.
- Rizvi R, Iqbal J, Mahmood I, Ali Ansari R. 2015. Comparative efficacy of different arbuscular-mycorrhizal fungal spp. (AMF) on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Science & Technology* 1: 13–26.
- Rohilla R, Singh US, Singh RL. 2002. Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Pest Manag. Sci* 58: 63–69.
- Rosahl S. 1996. Lipoxygenases in plants: their role in development and stress response. *Z Naturforsch* 51: 123-138.
- Roupheal Y, Cardarelli M, Di Mattia E, Tullio M, Rea E, Colla G. 2010. Enhancement of alkalinity tolerance in two cucumber genotypes inoculated with an arbuscular mycorrhizal biofertilizer containing *Glomus intraradices*. *Biol. Fertil. Soil* 46: 499–509.
- Rouzet J, Magnien C, Pueyo C, Jacob S, Jacquin D. 2007. Un exemple d’OAD: dix ans de travaux sur l’oïdium de la vigne. *Phytoma*, N°603. SRPV Languedoc, SRPV Bourgogne, FREDON Bourgogne. p. 26–29.
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R. 2006. Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytologist* 171: 693–698.
- Ruíz-Sánchez M, Aroca R, Mufioz Y, Polon R, Ruiz-Lozano JM. 2010. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of plant physiology* 167: 862– 869.
- Ryals J, Uknes S, Ward E. 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 104: 1109–1112.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809–1819.
- Ryan CA. 1990. Protease inhibitors in plant: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425–449.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Par’è PW. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1017–26.
- Ryu CM, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW. 2014. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*. 160: 413–20

S

- Sadhana B. 2014. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as a Biofertilizer. *Journal of current microbiology and applied sciences* 3: 384–400.

- Safir G. 1968. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the resistance of onion to *Pyrenochaeta terrestris*. M. Sc. Thesis, University of Iuinois, Urban.
- Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher RA, Lang J, Wiemken A, Kim D, Cook DR, Boller T. 2000. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 13: 763–777.
- Salzer P, Corbière H, Boller T. 1999. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus mosseae*. *Planta* 208: 319–325.
- Sánchez-Vallet A, Lopez G, Ramos B, Delgado-Cerezo M, Riviere MP, Llorente F, Fernández PV, Miedes E, Estevez JM, Grant M, Molina A. 2012. Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates *Arabidopsis* resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiol* 160: 2109–2124.
- Sancholle M, Dalpé Y, Grandmougin-Ferjani A. 2001. Lipids of mycorrhizae, in: Esser K, Hock, B (Eds.). The mycota IX. Fungal association, Germany, Springer-Verlag pp. 63–93.
- Sanders FE, Tinker PB. 1973. Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science* 4: 385–395.
- Sang Y, Cui D, Wang X. 2001. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 1449–1458.
- Scandalios JG. 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv Genet* 28: 1–41
- Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995–1014.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Bompadre J, Vierheilg H, Ocampo JA, Godeas A. 2007. The effect of flavones and flavonols on colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal fungi of the genera *Gigaspora* and *Glomus*. *Canadian journal of microbiology* 53: 702–709.
- Schaarschmidt S, González MC, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U, Hause B. 2007. Regulation of arbuscular mycorrhization by carbon. The symbiotic interaction cannot be improved by increased carbon availability accomplished by root-specifically enhanced invertase activity. *Plant Physiology* 143: 1827–1840.
- Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B. 2006. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato *Lycopersicon esculentum* roots. *Journal of Experimental Botany* 57: 4015–4023.
- Schliemann W, Ammer C, Strack D. 2008. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochem* 69: 112–146.
- Schreiner RP, Bethlenfalvay GJ. 1995. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 271–285.
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D. 2006. Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444: 933–966.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413–1421.
- Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. In: Libraries at Royal Botanic Garden Edinburgh, Kew, Botanische Staatssammlung Munich and Oregon State University, Gloucester, UK, 56 p.
- Schüßler A., Martin H., Cohen D., Fitz M., Wipf D. 2007. Studies on the Geosiphon symbiosis lead to the characterization of the first Glomeromycotan sugar transporter. *Plant Signaling and Behavior* 2: 314–317.
- Seutin B, Bodso B. 2012. Livre blanc « céréales » Ulg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA –W Gembloux.
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds DD, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG. 1995. Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* 108: 7–15.
- Shah J. 2005, Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 43:1–32.
- Sharda Khade W, Rodrigues BF. 2009. Studies on arbuscular mycorrhisation of papaya. *African Crop Science Journal* 17: 155–165.
- Sharma MP, Adholeya A. 2000. Sustainable management of arbuscular mycorrhizal fungi in the biocontrol of soil-borne plant diseases. In: Upadhyay RK, Mukerji KG, Chamola BP (eds) *Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture*. Vol. I. Crop diseases. Kluwer/Plenum, New York, pp 117–138.

- Shaul O, Galili S, Volpin A, Ginzberg I, Elad Y, Chet I, Lapulnik Y. 1999. Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe interactions* 12: 1000-1007.
- Shetty NP, Jensen JD, Knudsen A, Finnie C, Geshi N, Blennow A, Collinge DB, Jørgensen HJL. 2009. Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60: 4287-4300.
- Shibata D. 1996. Plant lipoxygenase genes. p. 39-55. In G. Piazza (ed) Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes. AOCS Press, Champaign, IL.
- Shores M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol* 48: 21-43.
- Shrinkhala M. 2011. Study on the bioprotective effect of endomycorrhizae against *M. graminicola* in rice. Thèse Seutin
- Siasou E, Standing D, Killham K, Johnson D. 2009. Mycorrhizal fungi increase biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1341-1343.
- Singh A, Kirubakaran AI, Sakthivel N. 2007. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. *Protein Expression and Purification* 56:100-109.
- Singh S, Kajal Srivastava JC, Badola, Sharma AK. 2012. Aeroponic production of AMF inoculum and its application for sustainable agriculture. *Wudpecker Journal of Agricultural Research* 1: 186-190.
- Slezacek S, Dumas-Gaudot E, Paynot M, Gianinazzi S. 2000. Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13: 238-241.
- Slusarenko AJ. 1996. The role of lipoxygenase in plant resistance to infection. In G Piazza (ed) Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes. AOCS Press, Champaign, IL 176-197
- Smart MG, Aist JR, Israel HW. 1986. Structure and function of wall appositions.1. General histochemistry of papillae in barley coleoptiles attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Can. J. Bot* 64: 793-801.
- Smith FA, Grace EJ, Smith SE. 2009. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 182: 347-358.
- Smith SE, Facelli E, Pope S, Smith FA. 2010. Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of Arbuscular Mycorrhizas. *Plant and Soil* 326:3-20.
- Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. San Diego, CA: Academic Press.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* 133: 16-20.
- Song F, Song G, Dong A, Kong X. 2011. Regulatory mechanisms of host plant defense responses to arbuscular mycorrhiza. *Acta Ecologica Sinica* 31: 322-327.
- Song YY, Cao M, Xie LJ, Liang XT, Zeng RS, Su YJ, Huang JH, Wang RL, Luo SM; 2011. Induction of DIMBOA accumulation and systemic defense responses as a mechanism of enhanced resistance of mycorrhizal corn (*Zea mays* L.) to sheath blight. *Mycorrhiza* 21: 721-731.
- Sood SG. 2003. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 219-227.
- Spann TM, Schumann AW. 2013. Mineral Nutrition Contributes to Plant Disease and Pest Resistance. UF/IFAS Extension.
- Spoel SH, Dong X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol* 12: 89-100.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the non-Vam species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Can J Bot* 75: 998-1005.
- Stein E, Molitor A, Kogel K-H, Waller F. 2008. Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiology* 49: 1747-1751.

- Steinkellner S, Hage-Ahmed K, García-Garrido J. M., Illana A, Ocampo JA, Vierheilig H. 2011. A comparison of wild-type, old and modern tomato cultivars in the interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycorrhiza* 22: 189–94.
- Steinkellner S, Lenzemo V, Langer I, Schweiger P, Khaosaad T, Toussaint J-P, Vierheilig H. 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* 12: 1290–1306.
- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA. 1992. Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* 10: 405–412.
- Stumpe M, Carsjens JG, Stenzel I, Gobel C, Lang I, Pawlowski K, Hause B, Feussner I. 2005. Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 66: 781–791.
- Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P. 2006. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* 107: 24–253.
- Sutton PN, Henry MJ, Hall JI. 1999. Glucose and not sucrose is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta*. 208: 426–430.
- Swarup R, Péret B. 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers – an overview. *Front. Plant Sci.* 3: 1-11.

T

- Tahat MM, Sijam K, Othman RR. 2012. Ultrastructural changes of tomatoes *Lycopersicon esculentum* root colonized by *Glomus mosseae* and *Ralstonia solanacearum*. *African Journal of Biotechnology* 11: 6681–6686.
- Tahiri-Alaoui A, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S. 1993. Immunocytochemical localization of pathogenesis-related PR-1 proteins in tobacco root tissues infected *in vitro* by the black root rot fungus *Chalara elegans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 69–82.
- Takezawa D. 1999. Elicitor- and A23187-induced expression of *WCK-1*, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. *Plant Molecular Biology* 40: 921–933.
- Tamogami S, Kodama O. 2000. Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochemistry* 54: 689–94.
- Tawaraya K. 2003. Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* 49: 655–668.
- Tayeh C, Randoux B, Vincent D, Bourdon N, Reignault P. 2014. Exogenous trehalose induces defenses in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology* 104: 293–305.
- Tayeh C. 2012. Induction de résistances chez le blé (*Triticum aestivum* L.) lors d’une interaction compatible avec *Blumeria graminis* (CD. E.O Speer): mécanismes mis en jeu après applications de tréhalose et d’heptanoyl d’acide salicylique, dérivé fonctionnalisé de l’acide salicylique. PhD thesis, Université du Littoral Côte d’Opale, Calais, France.
- Temperini O, Roupheal Y, Parrano L, Biagiola E, Colla G, Mariotti R, Rea E, Rivera CM. 2009. Nursery inoculation of pepper with arbuscular mycorrhizal fungi: An effective tool to enhance transplant performance. *Acta Hort. (ISHS)* 807: 591–596.
- Thordal-Christensen H, Zhang ZG, Wei YD, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187–1194.
- Tian C, Kasiborski B, Koul R, Lammers PJ, Bucking H, Shachar-Hill Y. 2010. Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiology* 153: 1175–1187.
- Tisdall JM. 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil* 159: 115–121.
- Tisserant E, Kohler A, Dozolme-Seddas P, Balestrini R, Benabdellah K, Colard A, Croll D, Da Silva C, Gomez SK, Koul R, Ferrol N, Fiorilli V, Formey D, Franken P, Helber N, Hijri M, Lanfranco L, Lindquist E, Liu Y, Malbreil M, Morin E, Poulain J, Shapiro H, van Tuinen D, Waschke A, Azcón-Aguilar C, Bécard G, Bonfante P, Harrison MJ, Küster H, Lammers P, Paszkowski U, Requena N, Rensing SA, Roux C, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Tuskan G, Young JP, Gianinazzi-Pearson V, Martin F. 2012. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol* 193: 755–769.

- Todd JF, Paliyath G, Thompson JE. 1990. Characteristics of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiology* 94: 1225–1232.
- Toyoda H, Matsuda Y, Yamaga T, Ikeda S, Morita M, Tamai T, Ouchi S. 1991. Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells. *Plant Cell Reports* 10: 217–220.
- Troch V, Audenaert K, Vanheule A, Bekaert B, Höfteb M, Haesaert G. 2014. The importance of non-penetrated papillae formation in the resistance response of triticale to powdery mildew (*Blumeria graminis*). *Plant Pathology* 63: 129–139.
- Trotta A, Vaneseg C, Gnavie, Fascona, Sampo S, Bertag. 1996. Le rôle des champignons mycorrhiziens et les micro-organismes non-mycorhiziens dans la nutrition fer d'agrumes. *Biol du sol Biochem* 24: 857–864.
- Tuzun S. 2006. Terminology related to induced systemic resistance: incorrect use of synonymous may lead to a scientific dilemma by misleading interpretation of results. In: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 1-8.

V

- van der Ent S, Van Wees SCM, Pieterse CMJ. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70 :1581–1588
- van der Luit A, Piatti T, van Doorn A, Musgrave A, Felix G, Boller T, Munnik T. 2000. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiology* 123:1507–1515.
- van Loon LC et Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85–97.
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol* 36: 453–83.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of inducible defenselated proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135–162
- van Loon LC, van Kammen A.1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 190–211.
- van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85–97.
- van Wees SCM, Pieterse CMJ, Trijssenaar A, Van 't Westende YAM, Hartog F, Van Loon LC. 1997.
- van Wees SCM, Van der Ent S, Pieterse CMJ. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* 11: 443–448
- Velivellia SLS, Lojanbc P, Cranenbrouckc S, de Bouloisc HD, Suarezb JP, Declercck S, Francod J, Prestwicha BD. 2015. The induction of Ethylene response factor 3 (ERF3) in potato as a result of co-inoculation with *Pseudomonas* sp. R41805 and *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 – a possible role in plant defense. *Plant Signaling & Behavior* 10: 2.
- Vargas JM Jr. 1973. A benzimidazole resistant strain of *Erysiphe graminis*. *Phytopathology* 63: 1366–1368.
- Venisse J, Gullner G, Brisset M. 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of Pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* 125, pp. 2164–2172.
- Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Grandmougin-Ferjani A, Durand R. 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* 16: 397–405.
- Verhagen BMW, Glazebrook J, Zhu T, Chang H-S, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 17: 895–908.
- Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645–655.
- Veronesi C, Rickauer M, Fournier J, Pouenat ML, Esquerre-Tugaye MT. 1996. Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* interaction. *Plant Physiol* 112: 997–1004.
- Vierheilig H, Steinkellner S, Khaosaad T, Garcia-Garrido JM. 2008. The biocontrol effect of mycorrhization on soil-borne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? In:

- Varma A (ed) Mycorrhiza: genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics. Springer, Heidelberg/Germany, pp 307–320.
- Vigers AJ, Wiedemann S, Roberts WK, Legrand M, Selitrenikoff CP, Fritig B. 1992. Thaumatin-like pathogenesis-related protein is antifungal. *Plant Science* 83: 155–161.
 - Vigo C, Norman JR, JE, Hooker. 2000. Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology* 49: 509–514.
 - Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol* 47:177–206.
 - Voigt CA. 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Plant Science* 5:168.
 - Volpin H, Elkind Y, Okon Y, Kapulnik Y. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiology* 104: 683– 689.
 - Volpin H, Phillips DA, Ocón Y, Kapulnik Y. 1995. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiology* 108: 1449–1454.
 - Vos C, Claerhout SMk, Awire R, Panis B, De Waele D, Elsen A. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce root-knot nematode penetration through altered root exudation of their host. *Plant Soil* 354: 335–345.

W

- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, Von Wettstein D, Franken P, Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformis indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Science* 102: 13386–13391.
- Waller F, Mukherjee K, Deshmukh SD, Achatz B, Sharma M, Schäfer P, Kogel K-H. 2008. Local and systemic modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species. *Journal of Plant Physiology* 165: 60-70.
- Wang X, Devaiah, SP, Zhang W, Welti R. 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* 45: 250–278.
- Wani SP, McGill WB, Tewari JP. 1991. Mycorrhizal and common root-rot infection and nutrient accumulation in barley grown on Breton loam using N from biological fixation or fertilizer. *Biology and Fertility of Soils* 12:46–54.
- Wanlei W, Yong L, Chen J, Xianglong J, Haibo Z, Guang W. 2009. Impact of intercropping aphid resistant wheat cultivars with oilseed rape on wheat aphid (*Sitobion avenae*) and its natural enemies. *Acta Ecologica Sinica* 29 p. 186–191.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J. 2008. An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol. Plant* 1: 198–217.
- Wäspi U, Schweizer P, et Dudler R. 2001. Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *The Plant Cell* 13: 153–161.
- Wasternack C, Parthierb. 1997. Jasmonate-signalled gene expression. - *Trends in Plant Sei* 2: 302–307.
- Watanabe N, Lam E. 2006. Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J.* 45: 884–894.
- Weber H. 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* 7: 217–224.
- Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC. 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedologia* 53: 197–201.
- Wei YD, Neergaard E, Thordal-Christensen H, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V. 1994. Accumulation of a putative guanidine compound in relation to other early defence reactions in epidermal cells of barley and wheat exhibiting resistance. *Physiol. Mol. Plant Patol* 45: 469–484.
- Whipps JM. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot* 82: 1198–1227.
- Wi SG, Singh AP, Lee KH, Kim YS. 2005. The pattern of distribution of pectin, peroxidase and lignin in the middle lamella of secondary xylem fibres in alfalfa (*Medicago sativa*). *Ann. Bot* 95: 863–868.

- Wijaya R, Neumann GM, Condrón R, Hugues AB, Polya GM. 2000. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science* 6: 243–255.
 - Wittstock U, Gershenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 1369–5266.
 - Wright SF, Upadhyaya A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198: 97–107.
- Wu QS, Li GH, Zou YN (2011) Roles Of Arbuscular Mycorrhizal Fungi On Growth And Nutrient Acquisition of Peach (*Prunus persica* L. Batsch) Seedlings. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 21: 746–750.

X

- Xing T, Ouellet T, Miki BL. 2002. Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant/pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7: 224–230.

Y

- Yamaoka N, Takeuchi Y. 1999. Morphogenesis of the powdery mildew fungus in water (4). The significance of conidium adhesion to the substratum for normal appressorium development in water. *Physiol Mol Plant Pathol* 54:145–154
- Yao MK, Desilets H, Charles MT, Boulanger R, Tweddell RJ. 2003. Effect of mycorrhization on the accumulation of rishitin and solavetivone in potato plantlets challenged with *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza* 13: 333–336.
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S, Nakashita H. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1678–1692.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* 30: 529–539.
- Yokoyama K, Aist JR, Bayles CJ. 1991. A papilla-regulating extract that induces resistance to barley powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 1–78.

Z

- Zafar U. 2003. Effect of different levels of P on two cultivars of cotton differing in resistance to leaf curl virus. Pakistan, 116 p.
- Zamioudis C, Pieterse CM. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 139–150.
- Zeyen RJ, Ahlstrand GG, Carver TLW. 1993. X-ray microanalysis of frozen-hydrated, freeze-dried, and critical point dried leaf specimens: determination of soluble and insoluble chemical elements at *Erysiphe graminis* epidermal cell papilla sites in barley isolines containing MI-o and ml-o alleles. *Canadian Journal of Botany* 71: 284–96.
- Zeyen RJ, Carver TLW, Lyngkjaer MF. 2002. Epidermal cell papillae. In: Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver (eds) *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. St. Paul, MN: ASP Press 107–125.
- Zhang S. et Klessig DF. 2001. MAPK cascades in plant defense signalling. *Trends in Plant Science* 6: 520–527.
- Zheng HZ, Cui CL, Zhang YT, Wang D, Jing Y, Kim KY. 2005. Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:778–86.
- Zhu HH, Yao Q. 2004. Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *J Phytopathol* 152: 537–542
- Zhu X, Qi L, Liu X, Cai S, Xu H, Huang R, Li J, Wei X, Zhang Z. 2014. The wheat ethylene response factor transcription FACTOR PATHOGEN-INDUCED ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *rhizoctonia cerealis* and freezing stresses. *Plant Physiology* 164: 1499–1514.

- Zhu, YG, Smith SE, Barritt AR, Smith FA. 2001. Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant and Soil* 237: 249–255.

Annexes

Annexe 1 : Méthode d'extraction des ARNs et transcription inverse

En condition non-infectieuse, l'effet de la mycorhization sur l'expression des gènes a été évaluée sur la troisième feuille du maître-brin des plants de blé prélevée après 6 semaines de culture en présence ou non de *F. mosseae*. Puis, afin d'étudier l'influence de l'infection sur des plants mycorhizés, la troisième feuille des plants de blé mycorhizés et âgés de 6 semaines a été prélevée à 0, 12 et 21h après l'infection (hai) par *Bgt* (5.10^5 spores / ml). Pour comparaison, la condition non-infectieuse a été obtenue en traitant les plants mycorhizés avec la solution de FC43 et les feuilles ont été prélevées à 0, 12 et 21h après traitement. Trois lots de feuilles ont été échantillonnés sur 3 pots différents, congelés en présence d'azote liquide pour stopper les activités enzymatiques et stockés à -80°C avant de leur utilisation. Les ARNs totaux sont isolés à partir de 100 mg de tissus congelés en utilisant le RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Pays-Bas) et en suivant les instructions du fabricant. L'ADN génomique contaminant a été éliminé par traitement d'une DNase via le kit DNasefree- RNase (Quiagen, Pays-Bas). Les ARN sont ensuite quantifiés en mesurant leur densité optique à 260 nm. 2 μg d'ARN totaux sont utilisés pour l'étape de transcription inverse (RT-PCR: reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction) réalisée avec le kit High Capacityc DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) selon les instructions fournies par le fabricant.

Annexe 2 : Méthode d'analyse de l'expression des gènes par PCR en temps réel

Les gènes ciblés sont liés aux réactions de défense. Certains d'entre eux ont été sélectionnés à partir d'études antérieures étudiant l'interaction du blé et de *Bgt* (*PAL*, *LOX* et *CHH*, Tayeh, 2012; Tayeh et al, 2013). Enfin deux couples d'amorces ont été nouvellement dessinés (*NPR1* et *POX*) pour cette étude. Les amorces de la *NPR1* et les gènes *POX* ont été conçus en utilisant le programme Primer Express et ont été testés pour la structure secondaire en utilisant le programme Net Primer. Les couples d'amorces utilisés lors de la réaction de quantitative RT-PCR sont présentés dans le tableau X. Les réactions d'amplification sont réalisées en temps réel sur ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, USA) et effectuées dans des plaques de 96 puits permettant la détection de la fluorescence. Le volume réactionnel est de 25 μL par puit et est composé du mélange suivant : 5,5 μL d'eau milliQ, 1 μL de chaque amorce et un mix réactionnel 12,5 contenant le SYBER green et le tampon adapté avec 5 μL de matrice diluée 10 fois (ADNc). Le SYBR green va se fixer sur le double brin d'ADN en place de l'ADN. Des témoins négatifs sont réalisés avec de l'eau milli-QTM. Les paramètres d'amplification sont : 15s à 95°C (dénaturation), 30 à 60°C (hybridation) et 30s à 72°C (élongation) pour 40 cycles. Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicate pour trois

réplicats biologiques. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage codant pour l'actine et exprimés selon le témoin correspondant à la valeur fixe de 1, nous parlerons alors d'expression relative. L'expression relative des gènes est considérée comme induite lorsqu'elle est supérieure à 2 ($\geq 2 X$) et réprimée lorsqu'elle est inférieure à 0,5 ($\leq 0.5 X$). Afin de déterminer si l'expression des gènes étudiée chez les plantes mycorhizées ou non-mycorhizées en condition infectieuse sont régulés de façon différente, le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn sont utilisés.

Annexe 3 : Valorisation

Actes de congrès:

- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Reignault Ph. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi as inducers of resistance against wheat powdery mildew. *AFPP–Association française de protection des plantes. Cinquième conférence internationale sur les méthodes alternatives de protection des plantes. Lille, France.*

- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Reignault Ph., Lounès-Hadj Sahraoui A. (2014). Arbuscular mycorrhizal inoculation as alternative method to protect wheat against powdery mildew. *Proceeding of Biological control of fungal and bacterial plant pathogens. the IOBC conference Biocontrol of Plant Diseases: “From the field to the laboratory and back again” (Uppsala, Suède).*

- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Reignault Ph. (2014). Mechanisms involved in mycorrhizal wheat protection against powdery mildew. *Commun Agric Appl Biol Sci. 79(3): 403-10.*

- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Reignault Ph., Lounès-Hadj Sahraoui A. (2013). Towards a more sustainable agriculture: arbuscular mycorrhizal inoculation protects wheat against powdery mildew. *Commun Agric Appl Biol Sci. 78(3):467-78.*

Communications orales:

- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Reignault Ph. (20th may 2014). Mechanisms involved in mycorrhizal wheat protection against powdery mildew. *66th International Symposium on Crop Protection Gent – Belgium.*

- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Reignault Ph., Lounés-Hadj Sahraoui A. (21th may 2013). Towards a more sustainable agriculture: Wheat mycorrhization to protect against powdery mildew. *65th International Symposium on Crop Protection, Gent – Belgium.*

 **Communications par affiches:**

- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Reignault Ph., Lounès-Hadj Sahraoui A. (11-13 Mars 2015). Arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against wheat powdery mildew. *AFPP–Association française de protection des plantes. Cinquième conférence internationale sur les méthodes alternatives de protection des plantes. Lille, France.*
- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Reignault Ph., Lounès-Hadj Sahraoui A. (15-17 Octobre 2014). The mycorrhizal inoculation as alternative method to fight against wheat powdery mildew. *Réseau Mycorhizes Francophones (JFM 4, Mycomed, Afrinom), Marrakech, Morocco.*
- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Reignault Ph., Lounès-Hadj Sahraoui A. (14-18 Jun 2014). Arbuscular mycorrhizal inoculation as alternative method to protect wheat against powdery mildew. *Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, Uppsala, Sweden.*
- **Mustafa G.**, Tisserant B., Randoux B., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Reignault Ph. (5-7 septembre 2012). Vers une agriculture plus durable: la mycorhization arbusculaire comme moyen de lutte contre l'oïdium du blé? *3^{ème} journées francophones sur les mycorhizes, Nancy, France.*
- **Mustafa G.**, Tisserant B., B. Randoux, Fontaine J., Deravel J., Reignault Ph., Lounès-Hadj Sahraoui A. (22th may 2012), Do arbuscular mycorrhizal fungi induce foliar resistance in wheat against powdery mildew? *64th International Symposium on Crop Protection, Gent – Belgium.*
- **Mustafa G.**, Randoux B., Tisserant B., Lounes-Hadj Sahraoui A. (15-17 septembre 2010). Etude de la protection du blé *Triticum aestivum* contre l'oïdium *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* par mycorhization en présence de différentes concentrations de phosphore. *2^{èmes} Journées Francophones des Mycorhizes (JFM2) Bruxelles – Belgium.*

Résumé

Protection du blé contre l'oïdium par des champignons mycorhiziens à arbuscules: mécanismes et optimisation

L'utilisation des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) pourrait constituer une alternative potentielle aux traitements fongicides conventionnels pour lutter contre les maladies cryptogamiques des plantes. Notre travail a consisté à étudier l'éventuel effet protecteur de la mycorhization arbusculaire chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) contre *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), un champignon biotrophe responsable de l'oïdium, une maladie affectant les parties aériennes de la plante.

L'inoculation mycorhizienne du blé avec le CMA *Funneliformis mosseae* (*Fm*), en conditions contrôlées et optimisées, nous a permis d'obtenir parallèlement à un taux de mycorhization de 38% des plants de blé, une amélioration significative de la biomasse et un taux de protection contre *Bgt* estimé à 78%. Ces résultats suggèrent l'induction d'une résistance systémique des réactions de défense du blé par mycorhization (Mycorrhiza-Induced Resistance, MIR). Cette protection serait liée à une accumulation de composés phénoliques et de peroxyde d'hydrogène dans les cellules épidermiques des feuilles de blé mycorhizé, au niveau du site de pénétration de *Bgt*. Une surexpression des gènes *POX*, *PAL*, *CH11* et *NPR1* codant pour des marqueurs de défense a également été mise en évidence dans les feuilles en absence d'infection par *Bgt*. Enfin, nos travaux ont également souligné l'intégration de divers paramètres pour optimiser l'utilisation des CMA comme agents de biocontrôle chez le blé. La meilleure protection contre l'oïdium a été obtenue avec un apport en phosphore réduit de 5 fois par rapport à celui préconisé au champ et un inoculum mycorhizien à base de *Fm*, que ce soit chez un cultivar modérément sensible ou un cultivar plus résistant.

Mots clés : Champignons mycorhiziens à arbuscules, oïdium, blé, résistance induite par la mycorhization, biocontrôle.

Abstract

Wheat protection against powdery mildew by arbuscular mycorrhizal fungi: mechanisms and optimization

The use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) could be an innovative alternative to chemicals against fungal plant diseases. Our work aimed at studying the possible protective effect of arbuscular mycorrhization in the bread wheat (*Triticum aestivum* L.) against *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), a biotrophic fungus responsible of wheat powdery mildew, a disease affecting the aerial plant organs. Wheat mycorrhizal inoculation by *Funneliformis mosseae* (*Fm*), under controlled and optimized conditions, allowed us to obtain concomitantly a mycorrhizal rate of 38%, a significant increase of plant biomass and a protection level against *Bgt* estimated at 78%. These results suggest the induction of systemic wheat defense reactions resulting from mycorrhization (Mycorrhiza-Induced Resistance-MIR). This protection is linked to an accumulation of phenolic compounds and hydrogen peroxide at the *Bgt* penetration sites in epidermal leaf cells of mycorrhized wheat plants. Up-regulations of *POX*, *PAL*, *NPR1* and *CH11* genes encoding for defense markers were also pointed out in leaves of mycorrhizal wheat in the absence of *Bgt* infection. Moreover, our study highlighted the importance of taking into account various parameters to optimize the use of AMF as biocontrol agents. The highest protection against powdery mildew was obtained with a 5-fold reduced phosphorus input compared to that recommended in the field and with the mycorrhizal inoculum *Fm*, in both a moderately susceptible or a more resistant cultivar.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, powdery mildew, wheat, mycorrhiza-induced resistance, biocontrol.