



HAL
open science

Improve the principles for selecting new bacterial biocontrol agents for FHB

Yoann Besset-Manzoni

► **To cite this version:**

Yoann Besset-Manzoni. Improve the principles for selecting new bacterial biocontrol agents for FHB. Ecology, environment. Université de Lyon, 2018. English. NNT : 2018LYSE1124 . tel-01916179

HAL Id: tel-01916179

<https://theses.hal.science/tel-01916179>

Submitted on 8 Nov 2018

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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1124

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341

Evolution Ecosystème Microbiologie Modélisation

Ecologie microbienne

Soutenue publiquement le 13 Juillet 2018, par :

Yoann Besset-Manzoni

Améliorer les principes de sélection de nouveaux agents bactériens de biocontrôle contre la fusariose du blé

Devant le jury composé de :

Valérie LECLERE, Maître de conférences, Université de Lille

Fabienne BAILLIEUL, Professeur, Université de Reims

Alexandre JOUSSET, Maître de conférences et de formation, Université d'Utrecht

Marc BARDIN, Directeur de recherche, INRA

Gilles COMTE, Professeur, Université de Lyon 1

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Claire PRIGENT-COMBARET, Directrice de recherche, CNRS

Pierre JOLY, PhD. Responsable R&D Agronomie Biovitis

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Améliorer les principes de sélection de nouveaux agents bactériens de biocontrôle contre la fusariose du blé

Résumé

Dans les années 1950, la révolution agricole a permis, *via* l'introduction d'intrants chimiques dans les cultures tels que les engrais et les pesticides, un bond dans les rendements et la productivité agricole. Elle coïncide avec le point de départ d'une forte explosion démographique mondiale. Toutefois, depuis quelques années, ces pratiques agricoles sont contestées, en particulier pour leurs effets néfastes sur l'environnement, la biodiversité et la santé humaine.

Pour lutter contre les nuisibles des cultures, de nouvelles voies ont été explorées et en particulier la lutte biologique (biocontrôle) qui utilise des moyens naturels ou des populations d'organismes pour réguler les populations de pathogènes. Les micro-organismes, que cela soit des champignons ou des bactéries, capables d'interagir avec les plantes ou les communautés microbiennes du sol, sont parmi les organismes couramment utilisés pour la protection des cultures.

Ces travaux de thèse se sont intéressés à trouver des candidats bactériens d'intérêt pour lutter contre *Fusarium graminearum*, un pathogène des céréales, responsable de fortes pertes de rendements.

Par une approche originale, consistant à conserver des souches non-inhibitrices de la croissance de la souche *F. graminearum* FG1 *in vitro* dans des tests effectués *in planta* pour évaluer leur capacité à protéger le blé contre la fusariose du collet, nous avons pu montrer les limites des méthodes de sélection conventionnelles. Nous avons également exploré, par une approche combinatoire, le potentiel de combinaisons de souches bactériennes à inhiber la croissance de *F. graminearum* et qui semble représenter un vrai futur dans le monde du biocontrôle. Cette approche a permis d'identifier une souche particulièrement efficace, *Bacillus amyloliquefaciens* JM3, dont l'exploration métabolique a permis de mettre en évidence de nouvelles molécules antifongiques potentielles de la famille des apo-caroténoïdes. Enfin, nous avons également exploré les mécanismes de la mise en place d'une résistance systémique chez le blé induite par l'inoculation d'un agent bactérien de biocontrôle, la souche modèle *Pseudomonas kilonensis* F113. Les travaux effectués dans cette thèse s'inscrivent dans la recherche de nouvelles ressources pour limiter l'utilisation des pesticides chimiques, mais aussi dans un besoin de mieux comprendre les interactions tripartites plante/phyto-pathogène/bactérie(s) bénéfique(s).

Mots clés : *Fusarium graminearum*, lutte biologique, blé, Bacillus, biopesticides

Improve the principles for selecting new bacterial biocontrol agents for FHB

Abstract

In the 1950s, the agricultural revolution, through the introduction of chemical inputs into crops such as fertilizers and pesticides, boosted yields and agricultural productivity. This matched with the starting point of a strong global population explosion. However, in recent years, these farming practices have been challenged, particularly for their adverse effects on the environment, biodiversity and human health.

To combat crop pests, new avenues have been explored, in particular biological control (biocontrol) that uses natural means or populations of organisms to regulate pathogen populations. Microorganisms, *i.e* fungi or bacteria, interacting with plants or microbial communities in the soil, are among the organisms commonly used for crop protection.

This PhD work has focused on finding bacterial candidates of interest to control *Fusarium graminearum* populations, a grain pathogen, which causes high crop yield losses. By an original approach, consisting in retaining non-inhibitory strains of the growth of the *Fg1* in *in-planta* assays against FHB, we were able to show the limitations of methods conventionally used to select biocontrol agents. We have also explored, through a combinatorial approach, the potential of combinations of bacterial strains to inhibit the growth of *F. graminearum* that seems to represent a real future in the world of biocontrol.

This allow us to identify a particularly effective strain, *Bacillus amyloliquefaciens* JM3, whose metabolic exploration has lead to the identification of new potential antifungal molecules of the apo-carotenoid family. Finally, we also explored the mechanisms involved in the establishment of a systemic resistance in wheat induced by the inoculation of a biocontrol bacterial agent, the model strain *Pseudomonas kilonensis* F113. The work carried out in this thesis is part of the research works currently developed for identifying new resources to limit the use of chemical pesticides, but also in a need to better understanding tripartite interaction between plant / phytopathogens / beneficial bacterium.

Key words : *Fusarium graminearum*, biocontrol, wheat, Bacillus, biopesticides.

Remerciement

Juillet 1998. Un petit garçon s'émerveille devant 22 bonhommes qui vont décrocher une étoile attendue depuis 68 ans par toute une nation. Le peuple français est dans la rue, ivre de bonheur. C'est décidé, le petit garçon ira taper dans un ballon en septembre.

Été 2008. Le petit garçon a grandi. Accompagné de Nono, il découvre le bonheur de décrocher son ticket pour les études supérieures. La vie universitaire s'ouvre à lui, mais il devra passer le cap sans son Nono, à jamais son étoile dans le cœur. Première leçon de vie.

Juillet 2018. Lille, Heraklion, Glasgow, Lyon. Du chemin de parcouru pour le petit garçon. Après 10 ans à écumer les bancs de l'université, d'être parti chasser les grenouilles en Crête, à avoir tenter, échouer, recommencer, il est temps pour le petit garçon d'aller chercher son étoile à mettre sur son maillot, entouré, de près ou de loin, de son équipe de « bonhommes » qui l'auront poussé, encouragé, soutenu dans cette folle aventure, avant, il l'espère pouvoir fêter une deuxième étoile pour toute une nation deux jours après.

La thèse est le fruit d'un travail d'équipe. Et il est venu l'heure, par ces quelques mots qui vont suivre de remercier les personnes qui ont pu participer, d'une manière ou d'une autre, à l'aboutissement de ces travaux.

Commençons par le commencement. Je tiens à remercier Jean Yves Berthon et Gérard Peyrac d'avoir cru au projet et d'avoir accepté de collaborer avec nous. Je remercie aussi Damien, mon co-directeur de l'entreprise, qui est parti voguer vers d'autres projets, mais qui a soutenu la démarche dès le début.

Je tiens à chaleureusement remercier Valérie Leclère, Fabienne Baillieux, Alexandre Jousset, Marc Bardin et Gilles Comte, les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèses. Je vous souhaite une très bonne lecture, en espérant que vous aurez plaisir à lire les « quelques lignes » qui suivront les remerciements.

Pour continuer sur les jurys, je tiens à remercier Christian Steinberg, Bernard Dumas, et Thierry Langin, membre de mon comité de suivi au cours de ma thèse, pour leur regard bienveillant et constructif lors de nos différents échanges. Ainsi que Guy pour avoir été mon tuteur E2M2, menant à bien ces deux comités de suivi.

Je remercie Yvan de m'avoir permis de faire mon M2 et ma thèse au sein du LEM, et je remercie l'équipe Rhizosphère, terre d'accueil au laboratoire pour ces 4 ans.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux encadrants de thèse : Claire et Pierre (qui a pris le bateau en route, un kinder surprise d'un poste de Responsable R&D). Merci à Claire de m'avoir laissé une grande autonomie au cours de ces 4 ans, qui ont permis de laisser libre cours à ma créativité scientifique, parfois sans doute un peu loufoque. Et merci à Pierre, qui malgré une arrivée en cours de route, s'est rapidement pris au jeu et a été d'une grande aide. Je tiens aussi à remercier Aline pour avoir assuré la transition entre mes deux co-directeurs, et son aide sur les expé de terrain.

Je tiens aussi à remercier l'équipe du GDEC à l'INRA de Clermont, dirigé par Thierry Langin, tout particulièrement Florence et Olivier pour leur aide lors des essais in planta. Mais aussi Foflo du LEM, pour les deux expéditions clermontoises de récoltes, pas le boulot le plus drôle...

Un immense merci à mes stagiaires Reda, Engjellush, Laurane, Maëva et Marion, la petite dernière, arrivé pendant la rédaction. Vous avez fait un super travail ! Et sans votre aide, ces travaux n'auraient pas la même saveur. Je vous souhaite le meilleur pour la suite, que cela soit dans la science ou ailleurs !

Comment ne pas remercier Marjo et Guillaume ! Cette dernière année au CESN à vos côtés épisodiquement m'ont fait un bien fou, à un moment de grand creux de ma thèse. Vous avez su me redonner du peps ! Et puis, vous m'avez fait découvrir la métabo, ses pannes mais aussi sa faible variabilité à faire pâlir les biologistes ! Mais aussi ces petites sessions LCSA avec Marjo et les arrêts au Bière du Temps pour remplir le stock. Et ce petit OL-Lille au parc OL à tes côtés Guillaume, un vrai plaisir, surtout le hot dog de la mi-temps :D Si regret il devait y avoir, ça aura été de ne pas avoir passé plus de temps avec vous au Forel. Je rajoute à cette liste Sergio et Gilles, qui ont été aussi d'une aide précieuse pour essayer d'identifier ces foutus apocaroténoïdes !

Comment ne pas remercier la vie étudiante et ces étudiants du laboratoire, qui aura été extraordinaire durant ces 4 ans ! Je vais certainement en oublier, sachez donc que je vous remercie tous d'avoir rendu ces 4 ans agréables au quotidien. Espérons que d'autres personnes en prennent de la graine 😊

Commençons par les copains de cordés que sont Zazou, Elo, Thib, et Quentin (je reviendrais sur ton cas plus tard). Merci de m'avoir intégré à votre bande en M1, moi jeune BOP au milieu des microbios. Les soirées de M2 resteront légendaires ! Je vous souhaite le meilleur pour la suite mes petits ! Merci aussi à Camille d'avoir été de la partie pour ces 3 ans, un peu de phyto avec nous.

Dans la cordée, et pas des moindres, un très grand merci à toi ma Lisou, co-bureau de l'extrême, mais aussi secrétaire de choc, résistant à toutes les tempêtes ! Les bons moments au bureau ne sont pas dénombrables ici, mais tu as permis de rendre les moments moins drôles un peu plus doux. Comme tu restes un peu plus longtemps, je te confie la garde nos plantes :D Pleins de courage pour cette dernière ligne droite, tu vas tout déchirer le jour J !

Merci à Marine d'avoir partagé notre bureau, d'avoir amené ta fraîcheur et ta simplicité ! Et d'avoir partagé avec nous notre amour des plantes vertes, avec plus ou moins de succès (RIP le bananier, vive le citronnier !). On voulait tellement pas d'abandonner que nous avons prolongé nos thèses plus que de raison :D

Et puis tous les autres actuelles, Soso, Sam, Wiwi, Béa, Lucas, Jordan, Colin, Florian, Lucas...Un petit big up à mon poulain, XL, dit le petit Xavier ! Profites bien, si tu finis par y aller, de cette belle ville de Saint Malo :) Et Momo, je sais qu'on va te manquer avec Quentin, mais tu sais qu'on se verra avec tous ces fifous du dimanche très régulièrement !

Un merci aux doctorants et docteurs du MAP, en particulier à Grand Kévin, mon alter-ego black amateur de rhum et à Simon, appelé Dark Simon les jours de grands Aperos !

Bon courage aux petits M2 de cette année ! Que cela soit au LEM ou ailleurs, je vous souhaite de trouver le chemin qui vont conviendra, et de la réussite dans cette voie :)

Un grand énorme merci aux anciens : Flo Barbi, Antoine, Guillaume, Super Marie, Jojo, Seb, Yoyo ler, Maxime, Clément, ! Vous avez été les piliers de cette ambiance magnifique ! Un merci tout particulier à Flo et Guillaume pour m'avoir gentiment dit « demande une conf au lieu d'un poster, au pire tu l'auras ton poster » et ainsi d'avoir décrocher une conf à PGPR...en anglais ! En grand merci aussi à Marie, mais aussi à Clément pour votre aide précieuse pendant le M2, vous avez été géniaux ! Et Antoine, mon petit Antoine, trop peu de lignes pour te dire merci. Chaque discussion en ta compagnie fut enrichissante, et je dirais qu'une phrase « Prend ton shooter café et on monte à Fourvière ! »

Un grand merci à l'Asso DocE2M2 que j'ai eu la chance de présider ou vice-présider pendant 3 ans. Une très belle expérience, enrichissante. Et la relève est assurée, alors je vous quitte l'esprit serein 😊

Il est maintenant temps de sortir des murs du Mendel et du Lwoff pour remercier les personnes qui ont contribué à mon épanouissement depuis quelques années ! La liste est longue...

Comment ne pas évoquer en premier les personnes qui ont fait mon quotidien ces 4 dernières années, qui ont été des meilleurs moments ! Des weekends à la pelle, un barathon, des derbys, des voyages ! Et encore pleins de très bons moments à venir dans les années à venir. J'appelle donc à la barre le Dimanche Fou dans son ensemble ! Quentin (encore toi !), Yann, Soso, Clairette, Mag, Momone, Sisi, Marie et Tim Tonic, Ben & Jesus, Thib, Jo, Marie T, Mamie Luc, Clem, Coco, Inès, Briac...mais aussi les derniers venus Toto et Momo ! A mon Ben avec qui nous partageons l'amour de la téquila et de Marthe, de m'avoir amener au Chaudron pour un Sainté-Lille de gala et cette petite mise au vert le dernier weekend avant l'impresion ! A mon Quentinounet, qui même exilé à Bordeaux ou Grasse occupe une place dans mon cœur, vivement l'année prochaine que tu reviennes ici avec ta douce ! Je vous aime tous très fort. Cœur cœur !

Tout tour est arrivé mon Quent ! Je ne sais même pas par où commencer. Je ne remercierais jamais assez la vie de m'avoir fait croiser ton chemin. Une personne d'exception, tu m'as fait grandir. Merci pour tout ! Bon je t'en veux un peu quand même que tu ne sois pas le jour J...mais, grâce à ta bière (et celle de Mag), tu seras avec nous ce jour là :D

Partons maintenant à Lille, qui a hébergé mes premières années universitaires, et sans doute mes plus belles. Merci à mes deux grands frères d'adoption, Bilel et Ugo, pour tous, sans vous la vie à la Résidence Van der Meersh n'aurait pas été la même ! Vous avez été deux piliers, deux modèles et vous le rester jour après jour. Ajoutons à cette liste Mathilde, Aline, Jasmine, Youbi, Ouallid et tous les autres, ces deux années à la résidence resteront à jamais dans ma mémoire ! Je remercie aussi les copains de l'IUT, qui m'ont fait vivre deux années extraordinaires ! La liste est trop longue, et même si je ne prends pas souvent des nouvelles, je vous souhaite le meilleur à tous !

Un grand merci à Petros Lymberakis, mon tuteur de stage en Crète, de m'avoir donné envie de continuer dans la recherche après quelques mois à pécher du tétard et à les élever. Et aussi à Manolis pour mes premières expéditions de terrain.

Saint Ch'mond deux minutes d'arrêt ! Merci à (Dr) Glad pour les Paradis Party, et ta bonne humeur. Un grand merci à Super Julie, héroïne des temps modernes, parti à la conquête de l'Amérique, tu auras rendu plus doux les quelques mois d'attente de la thèse, et ceux d'après, et ces quelques jours (heures ?^^) à Phylly, c'était le feu 😊

Revenons à Lyon ! Un grand merci à mes copains BOP ! L'écologie c'est la vie ! Deux années de licence très enrichissante. Un merci tout particulier à Nico, jeune docteur, et à Marion, futur brillante docteur ! A mon Titi, quelques mois ensemble, mais toujours là, même pour couper du bois !

Un grand merci au Who let the dog out, Pierre, Shimon, Lolo et Slimi entre autres ! Cette équipe de foot universitaire c'était de la balle, mais c'était avant tout une histoire de copains ! Et j'ajoute à cette liste la Team Marcelo avec Bruno, Tom, Camille, Bastien, l'équipe du jeudi soir à la fac ! Mention spéciale à Captain Bruno qui m'a amené au rugby ! Comment évoquer le foot universitaire, sans parler de Coach Popp ! Ça été un immense plaisir de vous côtoyer toute ces années, merci de m'avoir pris comme coach assistant pour les filles, ça été une très belle expérience ! Merci Coach, vous êtes une personne en Or ! Longue vie au directeur du SUAPS !

Un grand merci à la Team JUDO ! Philou, Ewen, Anais, Pierrick et les autres ! Mais surtout à Maître Cédric et ses passages de ceintures express ! Grâce à vous, j'ai pu conquérir, au prix de combats acharnés, deux titres universitaires dans ma catégorie ! Et prendre aussi un certain coup de vieux 😊

Et que dire de mes Gaillards ! Dans le rugby, y'a le ballon et les copains. Quand y'a plus de ballons, il reste les copains ! Des copains assez fêlés pour faire de moi, ancien footeux, leur président, pour faire renaître de ses cendres le GSL, une institution vieille de 40 ans, sous le nom des Gaillards Sans Lumière ! Etre à vos côtés sur le terrain a été un bonheur et un havre de paix quand la thèse battait de l'aile. Merci à tous, nouveaux, anciens, jeune, moins, jeune, de faire de ce club un club de copains où il fait bon vivre !

Un petit merci particulier à mon Remi ! Le squatteur de la rue Paul Bert ! Cet été de folie à Hansen il y a 5 ans...et maintenant, te voilà, en juin, parmi nous à Lyon ! Tu vas pouvoir figoler l'apprentissage de ton padawan :D

Et pour finir, un très grand merci à ma famille, présente et passée, et tout particulièrement à mes parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes différents périple de vie. Merci pour tout ! Merci à Marine, ma grande sœur, qui restera un modèle de courage et de débrouillardise sans fin. Tonton & Tatie et les cousins. Je vais tacher de me rattraper de ces dernières années, peu présent à vos côtés.

Nono, cette thèse, elle est pour toi. Et la première coupe de soupe de champagne, je la trinquerais avec toi, de loin, et tu me diras « Bien joué petit gars », et on retournera aux Sables tous les deux.

On ne retrouvera jamais l'émerveillement
Que l'on avait enfant
Tout se complique lorsque l'on devient grand
Mais il ne faudrait pas non plus s'en faire accroire
Et vivre sans espoir
La vie n'est pas juste un long purgatoire
S'il est vrai qu'il faut se battre au quotidien
Il n'en sera pas vain
L'effort sait faire apprécier le bon vin
A quoi bon s'en faire et nous apitoyer
On va tous y passer
Tant qu'à être là vaut mieux en profiter

Une autre journée qui se lève – Les Cowboys Fringuants

Sommaire

Liste des Figures	1
Liste des tableaux.....	3
Avant-propos	4
Synthèse bibliographique	7
Chapitre 1 - Histoire de l'agriculture : des prémices à aujourd'hui	8
A. Apparition de l'Agriculture dans le monde : la première révolution agricole.....	8
B. Evolution de l'Agriculture en Europe de -9000 ans à nos jours	9
B.1 Evolution de l'Agriculture au Néolithique.....	9
B.2 Evolution de l'Agriculture durant l'Antiquité.....	10
B.3 Evolution de l'Agriculture durant le Moyen-Âge	11
B.4 Evolution de l'Agriculture durant l'Epoque Moderne	12
B.5 Evolution de l'Agriculture durant l'Epoque Contemporaine	13
Chapitre 2 - Conséquences écologiques de l'intensification de l'agriculture	17
A. Fragmentation du paysage agricole	17
B. Impact de l'usage intensif des pesticides sur la biodiversité	19
B.1 Les fongicides et insecticides	20
B.2 Les herbicides	22
Chapitre 3 - Quelles conséquences de l'agriculture sur les services écosystémiques	24
A. Les services écosystémiques : qu'est-ce que c'est ?.....	24
B. Les services écosystémiques dans l'agriculture	26
Chapitre 4 - Principales maladies fongiques du blé.....	29
A. Les principaux pathogènes fongiques du blé	29
A.1 Puccinia spp.....	29
A.2 Blumeria graminis.....	30
A.3 Zymoseptoria tritici	30
B. Fusarium graminearum, l'agent causal des fusarioses	31
Chapitre 5 - La lutte intégrée dans le contrôle de Fusarium graminearum	35
A. Notions d'IPM (Integrated Pest Management), la lutte intégrée contre les nuisibles	35
B. Les moyens de lutte contre Fusarium graminearum	36
B.1 Les moyens de lutte actuels : pesticides et variétés résistantes	36
B.2 Les pratiques de lutte intégrée sur Fusarium graminearum	39
B.2.1 Les pratiques agricoles.....	39
B.2.2 La rotation des cultures.....	40
B.2.3 L'utilisation d'engrais et la limitation de la présence de mauvaises herbes	40
B.2.4 L'irrigation	40
B.2.5 L'utilisation de micro-organismes	41

B.2.5.1 Dans le contrôle de l'inoculum primaire	41
B.2.5.2 Dans la lutte biologique lors d'une infection par <i>Fusarium graminearum</i>	41
Chapitre 6 - L'utilisation des coopérations microbiennes dans l'agriculture	43
Partie 1	62
Chapitre 7 - Does selecting the best bacterial Biocontrol agents in vitro guarantee success in planta? A Wheat-Fusarium study case.....	63
Introduction.....	64
Material and Methods.....	66
Results 70	
Discussion.....	80
Conclusion	85
Partie 2	97
Chapitre 8 – Exploration du potentiel inhibiteur des consortiums	99
Introduction.....	99
Matériel et Méthodes	100
Résultats.....	101
Discussion.....	107
Chapitre 9 – Approche comparative pour déterminer les molécules inhibitrices de JM3 (publication en cours de rédaction)	112
Deciphering the antifungal activity of the <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain JM3 by coupling comparative genomics and metabolomics approaches.....	112
Introduction.....	113
Materials and Methods	114
Results 117	
Discussion.....	126
Conclusion	128
Partie 3	143
Chapitre 10 – L'interaction blé – Fg – F113 du point de vue de l'induction d'une résistance systémique..	144
Introduction.....	144
Matériel et Méthodes	145
Résultats.....	153
Discussion.....	161
Conclusion	166
Discussion générale.....	168
Références	181

Liste des Figures

❖ Synthèse bibliographique

Figure 1 - Voies de colonisation de l'Europe au cours du Néolithique.....	9
Figure 2 - Exemple de l'évolution des rendements de blé dans une ferme pilote du Royaume-Uni entre 1850 et 2010.	15
Figure 3 - Usage des pesticides aux Etats-Unis et répartition selon les familles de molécules concernées.	19
Figure 4 - Evolution du marché « Pesticides » entre 2000 et 2012.	20
Figure 5 - Représentation des fonctions rendues par les écosystèmes et des valeurs écologiques, économiques et socio-culturelles qui peuvent en être retirées.	24
Figure 6 - Cycle d'infection de <i>Fusarium graminearum</i>	33
Figure 7 - Les différents pratiques de l'IPM.....	36

❖ Partie 1

Figure 1 - Histogram describing the composition of the wheat-rhizosphere bacterial library.....	71
Figure 2 - Mycelium growth inhibition activity (SEm index) for the 205 bacterial isolates of the library according to their rrs taxonomical affiliation.	73
Figure 3 - Spore germination inhibition activity (SEs index) for the 47 strains selected after the first inhibition test, according to their rrs-based taxonomical affiliation.....	76
Figure 4 - Selection of strains for in planta tests according to their SEm and SEs indexes.....	77
Figure 5 - Discriminant principal component analysis (PCA) on plant growth and disease symptom parameters of wheat inoculated with the 14 selected strains in presence of <i>F. graminearum</i> Fg1.....	79
Figure S 1 – Description of index SEm.	92
Figure S 3 - Distribution of strains according to their soil of origin.....	93
Figure S 4 - Inhibition index SEm (%) depending of the bacterial genera.....	94
Figure S 5 - Inhibition index SEm (%) according to bacterial genera and soil origin	95
Figure S 6 - Global results of the different parameters recorded during in planta experiments for the different strains tested.....	96

❖ Partie 2

Figure 1 - Croissance bactérienne, estimée par une densité optique à 600nm, lors des cultures avec les différentes combinaisons.	102
Figure 2 - Répartition des combinaisons selon les souches étudiées.	103
Figure 3 - Répartition des combinaisons en fonction du nombre de souches par combinaison.....	104
Figure 4 - Représentation des 20% des meilleures combinaisons (Combi +) et des 20% des moins bonnes combinaisons (Combi -) en fonction du nombre de bactéries au sein des combinaisons et selon les souches. ...	105
Figure 5 - UHPLC-Q-TOF chromatograms recorded at UV=280 nm of culture supernatant of strains JM3 (blue) and AB42 (red) after their ethyl acetate extraction.	118
Figure 6 - UPLC-Q-TOF chromatograms recorded at UV=280 nm of each fraction obtained by the bio-guided fractionation of the supernatant culture of JM3 by semi-preparative HPLC.....	120
Figure 7 - In vitro evaluation of the <i>Fg</i> mycelial growth inhibition activity of each fraction.....	121

<i>Figure 8 - In vitro evaluation of the Fg spore germination inhibition activity of each fraction.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 9 - UV spectrum and ESI-MS (positive and negative) for each compound of interest.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 10 – Comparison of the proportions of total CDS in core-genome and in the variable genome between JM3 and AB42.</i>	<i>124</i>

❖ **Partie 3**

<i>Figure 1 - Dispositif expérimentale : représentation d'un bloc de traitement.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 2 - Schéma du dispositif expérimental.</i>	<i>152</i>
<i>Figure 3 - Dispositif expérimentale au bout de 2 semaines de culture.....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 4 - Résultats de l'intensité des symptômes au niveau du collet en fonction des différents traitements..</i>	<i>154</i>
<i>Figure 6 - Quantification des populations de Pseudomonas kilonensis F113 ou F113G22 au niveau du collet du blé.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 5 - Quantification de la population de F. graminearum présente dans le collet dans les différents traitements.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 8 - Quantification des populations de F113 ou F113G22 au niveau des racines du blé dans les différents traitements.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 7 - Quantification des populations de F. graminearum au niveau des racines du blé dans les différents traitements.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 9 - Intensité des nécroses au niveau du collet du blé dans l'expérience de triple-split-root.....</i>	<i>160</i>

❖ **Discussion générale**

<i>Figure 1 - Schéma récapitulatif des différents travaux effectués au cours de la thèse, avec les principaux buts atteints pour chaque partie.....</i>	<i>170</i>
<i>Figure 2 - Processus de sélection des bactéries en vue de produire un biopesticide.</i>	<i>172</i>
<i>Figure 3 - Principes de l'agroécologie.....</i>	<i>180</i>

Liste des tableaux

❖ Partie 1

Table 1. Statistical comparison of wheat growth and symptom traits between inoculation treatments..... 80

❖ Partie 2

Tableau 1 - Taux d'association entre 2 souches dans les Combi + et dans les Combi – 106

Tableau 2 - Probabilité d'association entre les souches dans les Combi + et les Combi –..... 107

Table 3 - MS spectral data for the 6 main compounds differentially produced by JM3 and AB42 123

Table 4 - Comparison of CDS numbers from JM3 and AB42 according to their COG classes 123

*Table 5 - Clusters involved in the biosynthesis of secondary metabolites detected in JM3 genome (using AntiSMASH prediction)..... **Erreur ! Signet non défini.***

Tableau S 1 Listes de combinaisons retenues dans les Combi+ et les Combi – avec les souches associées. 111

Table S 2 - Fifty eight secondary metabolites differently produced by strains JM3 and AB42..... 133

Table S 3 - Genomic objects of JM3 and AB42 135

Table S 4 - Genes specific to JM3 and absent in AB42..... 136

❖ Partie 3

Tableau 1 - Evaluation de l'intensité des nécroses..... 148

Tableau 2 - Amorces utilisées pour le suivi des populations de F113 et de Fg 149

Tableau 3 - Listes des amorces utilisés pour l'étude des gènes de défense 151

*Tableau 4 - Facteurs d'induction de l'expression des gènes de défense du blé, au cours du temps, en présence du pathogène *F. graminearum* Fg1 et/ou de la souche *P. kilonensis* F113..... 159*

Avant-propos

La naissance de l'agriculture constitue l'acte fondateur de la société humaine. Depuis ses débuts, jusqu'à nos jours, l'agriculture a contribué à façonner le monde qui nous entoure, et continuera de le faire pour les siècles à venir. Afin de comprendre la situation agricole actuelle, la **première partie** de l'Introduction de la synthèse bibliographique (Chapitres 1 et 2) décrit l'Histoire de l'Agriculture principalement en Europe, de ses débuts jusqu'à nos jours. Il nous a paru important de comprendre l'évolution des pratiques agricoles en Europe, ses crises et ses révolutions, afin de mieux anticiper son avenir et éviter de reproduire des erreurs passées : un enjeu majeur pour le siècle à venir.

Les humains ont colonisé une grande partie de la Terre, et se sont multipliés pour atteindre une population totale de plus de 7,6 milliards d'individus, à l'heure où ces lignes sont écrites (<http://www.worldometers.info/world-population/>), alors qu'ils n'étaient que d'un million aux prémices de l'Agriculture. Ce bouleversement nous amène à l'aube d'une crise de biodiversité qui pourrait conduire à la 6^{ème} extinction de masse, extinction à laquelle l'Agriculture intensive pratiquée à partir de la Révolution Verte n'est pas étrangère.

La **deuxième partie** de la synthèse bibliographique s'intéresse aux conséquences écologiques de l'Agriculture à partir du XX^{ème} siècle, et en particulier sur les populations de pathogènes fongiques dans les agro-systèmes (Chapitres 3 et 4). En effet, l'agriculture productiviste a permis de faire face aux problèmes d'insécurité alimentaire, mais au détriment de certains services écosystémiques. Ces services, rendus à l'Homme par la Nature, assurent en grande partie le bon fonctionnement des écosystèmes (Chapitre 3). Parmi ces services, se trouve la régulation des nuisibles et des pathogènes dans les agrosystèmes. Or la régulation des nuisibles et des pathogènes est impactée par la baisse de biodiversité au sein des agrosystèmes, résultante d'une intensification de l'agriculture au cours de ces deux derniers siècles. Ayant souvent moins d'agents de régulations, les populations de pathogènes vont pouvoir proliférer dans les champs, et en particulier dans les champs de blé, l'une des premières céréales produites au monde (Chapitre 4). Parmi ces pathogènes, *Fusarium graminearum*, modèle d'étude utilisé dans ces travaux de thèse, est un champignon capable non seulement d'impacter le rendement du blé mais aussi de contaminer les grains par des mycotoxines. La **troisième partie** de cette synthèse bibliographique s'intéresse aux méthodes qui peuvent permettre de réduire la pression parasitaire en grandes cultures, tout en respectant l'environnement (Chapitres 5 et 6). Les méthodes de lutte intégrée appelées IPM (pour *Integrated Pest Management*) intègrent de façon rationnelle différents moyens de lutte en particulier biologiques mais qui peuvent aussi être chimique (usage

limité au strict nécessaire), physique ou cultural afin de lutter contre des nuisibles (chapitre V). Parmi ces méthodes, l'utilisation de microorganismes dont des bactéries qui font preuve d'une grande capacité d'adaptation et sont impliquées dans grand nombre d'interactions positives, en particulier avec les plantes, en est une. En effet, certaines bactéries associées aux plantes sont capables d'inhiber la croissance de phytopathogènes *via* la production de composés antimicrobiens (antagonisme) ou *via* l'induction des réponses de défense des plantes. Ils sont souvent désignés sous les termes de microorganismes phytoprotecteurs ou d'agents de Biocontrôle. Au sein du microbiote racinaire, ces microorganismes participent à différentes interactions biotiques qui vont affecter leurs activités phytobénéfiques comme discuté au sein d'une revue intitulée 'Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies', parue dans 'Environmental Science and Pollution Research' en 2018 (Chapitre 6).

Actuellement, une attention grandissante est portée aussi bien dans les organismes de Recherche ou chez les professionnels de ce secteur (e.g. semenciers, concepteurs de solutions de protection des plantes) à l'isolement de ces microorganismes et la caractérisation de leurs mécanismes d'action afin de développer des stratégies de lutte biologique efficaces. C'est dans ce contexte que s'est situé mon projet de thèse. Il s'agit d'une thèse CIFRE entre l'équipe 'Rhizosphère' du laboratoire d'Ecologie Microbienne et la société BIOVITIS, filiale du groupe GREENTECH, qui développe, produit et commercialise des micro-organismes et des dérivés microbiens d'intérêt environnemental, agronomique et alimentaire. L'objectif appliqué de cette thèse était de rechercher de nouveaux microorganismes dans la rhizosphère du blé capables de protéger cette céréale vis-à-vis de *F. graminearum*, l'agent causal des fusarioses. L'utilisation de microorganismes issus de la rhizosphère du blé avait deux objectifs : i) le contrôle de l'inoculum primaire du pathogène, présent sous forme de spores ou de mycélium dans les sols (i.e : le maintien à un seuil de population compatible avec l'absence de développement d'épidémies) via des effets directs d'antagonisme et ii) une protection globale de la plante grâce à la mise en place d'une résistance systémique induite par les bactéries de la rhizosphère. Il s'agissait donc également de préciser leurs mécanismes d'action et d'identifier des leviers écologiques tels leurs interactions avec d'autres bactéries, pouvant affecter leur efficacité.

Au cours des travaux, c'est donc aux capacités à la fois d'antagonisme direct de ces bactéries (Chapitres 7, 8 et 9) et d'induction d'une résistance systémique chez la plante (chapitre 10) que nous nous sommes intéressées. Dans la **première partie**, nous avons procédé au crible d'une banque d'isolats pour leur capacité à inhiber la croissance mycélienne et la germination des spores de *F. graminearum*. Une sélection de souches les plus efficaces dans des tests *in vitro* a été réalisée afin de procéder à des essais de phytoprotection en serre sur blé (chapitre 7). Dans la **deuxième partie**, nous avons dans un premier temps voulu évaluer s'il était possible d'affecter la capacité des souches à inhiber *in vitro* *F.*

graminearum en les combinant entre-elles. Une approche combinatoire originale a été choisie qui a révélé qu'une souche bactérienne (*Bacillus amyloliquefaciens* JM3) en particulier présentait la meilleure activité quelles que soient les combinaisons dans lesquelles elle était associée (chapitre 8). Dans le chapitre suivant (Chapitre 9), nous avons tenté de découvrir la ou les molécules responsables de son effet inhibiteur en utilisant des approches de profilage métabolomique par UHPLC-Q-TOF (pour *ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry*) et de fractionnement bioguidé. Dans la **troisième partie**, nous nous sommes plutôt intéressés à découvrir l'induction d'une résistance systémique par *Pseudomonas kilonensis* F113, une souche modèle, permettant une protection du blé vis-à-vis de *F. graminearum* à l'aide d'une technique originale permettant de compartimenter le système racinaire d'une plante en 2 parties égales, ou 'split-root'. Ce système permet d'inoculer la souche biocontrôle dans le premier compartiment et le pathogène *F. graminearum* dans le second compartiment, et ainsi dissocier les effets d'antagonisme direct d'une part et les effets indirects *via* l'induction des défenses de la plante d'autre part (Chapitre 10). Enfin pour finir, la discussion générale permettra de remettre en perspective nos travaux dans le contexte de la lutte biologique vis-à-vis de *F. graminearum*. L'utilisation des micro-organismes dans cette lutte biologique, de ses avantages, mais aussi de ses risques seront discutés. Mais surtout, cette discussion permettra d'ouvrir un débat plus global sur le devenir de l'agriculture de demain. L'histoire de l'agriculture brièvement retracée dans la synthèse bibliographique nous a permis de prendre conscience que les problèmes liés à l'agriculture, mais aussi les solutions, ne sont pas simplement d'ordre scientifique, mais aussi écologique, politique, économique et social et qu'il est important de tenir compte de l'ensemble de ces dimensions lorsque l'on développe un produit.

Synthèse bibliographique

De la naissance de l'agriculture à la lutte biologique vis-à-vis

Fusarium graminearum

Chapitre 1 - Histoire de l'agriculture : des prémices à aujourd'hui

A. Apparition de l'Agriculture dans le monde : la première révolution agricole

L'histoire de l'Homme moderne, *Homo sapiens*, semblerait commencer aux alentours de – 300 000 ans en Afrique, à l'époque du Paléolithique. Les Hommes sont alors essentiellement des chasseurs-cueilleurs nomades, tributaires de l'environnement qui les entoure. Au cours de leur évolution, les outils vont se développer et se perfectionner (Ambrose, 2001).

A partir de -16 000 ans est observé le déclin de la période glaciaire entraînant l'apparition de nouvelles formations végétales. La période de – 16 000 à – 12 000 ans, appelée le Mésolithique, voit le foisonnement des outils de par le monde. Chaque région colonisée par l'Homme se différencie en fonction des outils et modes de prédation mis en place. Le début du Néolithique est marqué par l'apparition de la pierre polie. Alors que jusqu'à présent l'Homme s'était contenté de tailler la pierre, il peut maintenant utiliser des objets tranchants et réutilisables. D'autres inventions vont voir le jour et révolutionner les modes de vie des sociétés humaines : la construction d'habitats durables, la poterie en terre cuite, et surtout l'apparition des premières cultures et des premiers élevages (Bowles and Choi, 2016).

Avant le Néolithique, l'Homme utilisait déjà les fruits et les graines dans son alimentation. Dès lors, certaines sociétés néolithiques commencent à récolter des graines à partir de plantes sauvages, puis à les produire en les semant. La domestication de ces plantes est donc en marche. La transition d'une société de chasseur-cueilleur à une société pratiquant l'Agriculture a été longue et pendant très longtemps ces deux types de sociétés ont cohabité. Différents foyers au Néolithique ont permis la domestication de flores et de faunes propres, localement disponibles. A partir de ces foyers, l'agriculture s'est répandue dans toutes les zones occupées par l'Homme (Mazoyer and Roudart, 2006). Deux hypothèses sont avancées pour expliquer cette expansion géographique des sociétés pratiquant l'agriculture : (i) une expansion par colonisation progressive de territoires occupés ou non, ou (ii) une transmission de proche en proche des outils, des espèces domestiquées, des savoirs et savoir-faire agricoles aux sociétés de chasseurs-cueilleurs déjà en place sur un territoire. Il a fallu environ 9000 ans pour que l'Agriculture se répande sur toute la Terre (Keroualin, 2003).

L'apparition de l'agriculture lors de la révolution agricole du Néolithique a permis un meilleur contrôle de la production de ressources alimentaires et ainsi une plus grande indépendance vis-à-vis des conditions climatiques. Ces avancées ont permis la mise en place de sociétés nouvelles, devenues sédentaires, et surtout l'apparition de civilisations organisées et hiérarchisées.

B. Evolution de l'Agriculture en Europe de -9000 ans à nos jours

B.1 Evolution de l'Agriculture au Néolithique

L'arrivée de l'agriculture en Europe est principalement due à l'expansion du foyer proche oriental à partir de – 9500 ans (Figure 1).

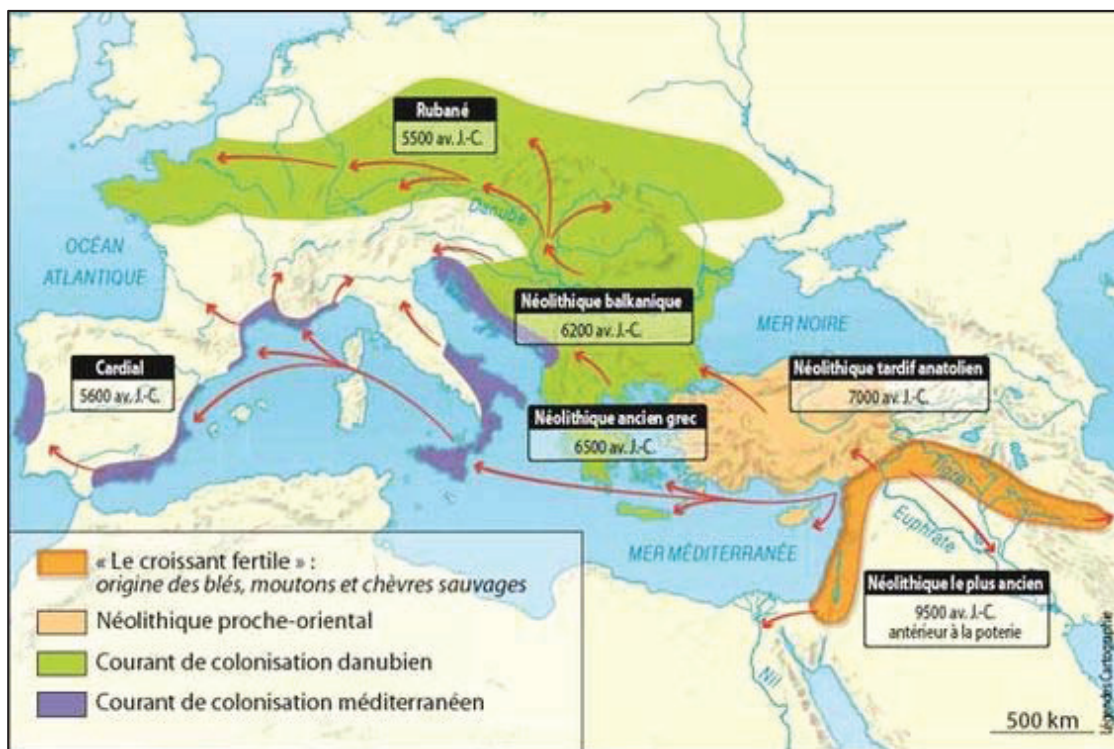


Figure 1 - Voies de colonisation de l'Europe au cours du Néolithique.

Illustration tirée de Giligny et al, 2007.

A cette époque, l'agriculture repose sur des cultures sur abattis-brûlis qui consistent à déboiser et brûler le bois afin de constituer une terre enrichie en carbone et éléments minéraux pour la culture. Une terre ainsi constituée ne peut être utilisable que pendant 1 à 3 années avant de voir le sol s'appauvrir (dégradation de la fertilité, développement de l'érosion, humidité plus faible qu'en présence de la forêt qui va progressivement amener à une désertification du sol). Il faut donc

régulièrement trouver de nouvelles terres à déboiser, ce qui a permis l'expansion de ce mode d'agriculture de proche en proche à partir du foyer Proche Oriental. Une fois qu'un terrain déboisé atteint sa limite de productivité, il est abandonné et mis en friche pour une durée de 5 à 50 ans afin que la biomasse aérienne puisse se reconstituer. L'augmentation croissante de la population à cette époque va progressivement conduire à des problèmes de déforestation. Cette époque correspond aussi au début de la domestication des animaux mais aussi des plantes d'intérêt agronomique. Et c'est au niveau du croissant fertile, actuellement le Moyen Orient (Figure 1), que sont retrouvées les premières plantes domestiquées, que cela soit des légumineuses (lentilles ou pois), ou des céréales (blé amidonnier et orge).

En ce qui concerne la domestication du blé (*Triticum*), elle a été un élément fondateur des premières civilisations humaines dans le croissant fertile. Deux principales espèces de blé, *Triticum aestivum* ou blé tendre et *Triticum turgidum* ou blé dur, sont encore cultivées de nos jours pour des applications différentes comme la panification et la production de pâtes, respectivement. Ces différentes espèces de blé ont été générées par des événements de polyploïdisation intervenus suite à des croisements entre 3 espèces sauvages diploïdes. Ainsi le blé hexaploïde (*Triticum aestivum*) est issu de deux événements de polyploïdisation. Il y a environ 500 000 ans, le premier événement de polyploïdisation a impliqué 2 espèces diploïdes (7 paires de chromosomes), *Triticum urartu* et *Aegilops speltoides*, ce qui a conduit à l'apparition d'une nouvelle espèce tétraploïde (14 paires de chromosomes), *T. diccoides* (amidonnier sauvage). Cette espèce a été domestiquée puis a évolué en *T. dicoccum* (amidonnier cultivé), qui est l'ancêtre du blé dur, *T. turgidum*. Le second événement de polyploïdisation a eu lieu il y a 10 000 ans, entre l'espèce domestiquée tétraploïde *T. dicoccum* et l'espèce sauvage diploïde *A. tauschii* ce qui a conduit à l'espèce hexaploïde (21 paires de chromosomes), qui est connue seulement sous sa forme domestiquée, *T. aestivum* ou blé tendre (Charmet, 2011). A la suite de l'expansion vers l'Europe, le cortège de plantes domestiquées s'est étoffé avec l'ajout de l'en grain, du lin, du seigle, et du pois chiche (Zohary et al., 2012).

B.2 Evolution de l'Agriculture durant l'Antiquité

C'est dans ces conditions que la révolution agricole de l'Antiquité pose ses bases en Europe aux environs de -3000/-2000 ans. D'une culture sur abattis-brûlis, le mode de production agricole va passer vers des cultures attelées légères, avec la culture des céréales sur des terres labourables et l'utilisation de rotation avec des jachères. Une jachère est une terre ayant été exploitée pour la culture et qui, dans un souci de régénération du sol, est laissée sans culture pendant une période de temps. Une terre cultivable deviendra une jachère après une période de culture et une jachère pourra de nouveau être une terre cultivable après avoir suivi une période de régénération. A ce système terre cultivée-jachère,

d'autres terrains (qualifiés de *saltus*) sont exploités pour le pâturage du bétail. Dans un système agraire avec jachère, l'utilisation du bétail est double : (i) le travail au champ, mais aussi (ii) la fertilisation des sols en jachère *via* les déjections. Mais pendant la révolution agricole de l'Antiquité, le rôle du bétail reste encore mineur, car les outils (par exemple l'araire) sont peu performants pour le travail de la terre. Ce dernier a donc encore lieu principalement à la main (Mazoyer and Roudart, 2006).

Durant cette période, les terres abandonnées après culture sur abattis-brûlis ont été réinvesties. De plus, les nouvelles méthodes de culture apparues pendant l'Antiquité ont permis une sédentarisation des populations, et le développement de villages plus grands. Néanmoins, les rendements à cette époque tournent autour de 3-4 quintaux à l'hectare, et ne permettent donc pas encore de nourrir une population grandissante (Mazoyer and Roudart, 2006).

Le système agraire avec jachère et culture attelées légères a perduré jusqu'au début du Moyen-âge, soit pendant environ 3000 ans quand il avait fallu 8000 ans pour passer d'un système agraire à abattis-brûlis à un système agraire à jachères. L'essor de nouveaux matériaux et outils plus perfectionnés (dont la roue) ont permis une nouvelle révolution agricole : la révolution agricole du Moyen-âge.

B.3 Evolution de l'Agriculture durant le Moyen-Âge

La révolution agricole du Moyen-Âge est basée sur un perfectionnement des outils, et le passage des cultures attelées légères aux cultures attelées lourdes. Ceci a été rendu possible grâce l'utilisation du char à roue pour l'agriculture ainsi qu'à la création d'un vrai outil de labour, la charrue, tractée par le bétail (Mazoyer and Roudart, 2006). D'autres usages ont vu le jour : l'usage du foin, le parage du bétail dans un endroit clos pendant la période creuse et l'emploi du fumier. Le char à roue a permis l'amélioration des capacités de transport sur de longues distances. Le fumier a ainsi pu être transporté de l'enclos où le bétail est parqué jusqu'aux champs, augmentant les apports de matières organiques dans les sols cultivés ou en jachère. Un autre outil, la faux, a permis une meilleure exploitation du foin.

Ces nouvelles techniques d'agriculture à travers l'Europe se sont démocratisées entre le IX et X^{ème} siècle et ont permis une croissance de la population sans toutefois combler pleinement les manques de vivres. Afin d'augmenter cette production, l'exploitation des champs est augmentée en réduisant le temps de jachère, entraînant rapidement une baisse de la productivité des sols. Les vivres vont donc commencer à se faire rares, d'autant plus dans les populations ouvrières et industrielles les plus pauvres, entraînant leur malnutrition et une baisse générale de leur résistance aux maladies (Mazoyer and Roudart, 2006). Consécutivement, la Peste va s'abattre sur l'Europe au cours du XIV^{ème} siècle, entraînant une baisse drastique de la population, y compris agricole, qui va demeurer la plus

touchée. Ceci va avoir pour conséquences d'amplifier les famines. Il est estimé que la Peste va être responsable, en un siècle, d'une baisse de la population de moitié, pour atteindre des niveaux de populations semblables au X^{ème} siècle.

Au début du XV^{ème} siècle, l'Europe se retrouve donc avec une population réduite de moitié, mais aussi avec beaucoup de terres agricoles mises en jachère naturelle, faute de main d'œuvre pour les exploiter, ainsi que de nombreux terrains issus de la déforestation qui ont pu naturellement se reboiser. Le regain va s'amorcer au début de ce siècle grâce à un rebond démographique et économique.

B.4 Evolution de l'Agriculture durant l'Epoque Moderne

Dès les débuts de la Renaissance, la rotation triennale agricole a été généralisée au sein de l'Europe. Accompagnée par des progrès majeurs en navigation, l'intensification des échanges a permis de compenser les écarts de productions agricoles entre régions.

Néanmoins, vers la fin du XVI^{ème} siècle, les rendements des cultures vont atteindre un plafond. Dans quelques régions d'Europe, se développe un nouveau système agraire : il s'agit de **la Première Révolution Agricole des Temps modernes** qui repose sur l'abandon de la jachère au profit de nouvelles cultures comme des prairies fourragères ou des plantes sarclées fourragères. Cette révolution ne vise pas, dans un premier temps, à augmenter la production alimentaire par remplacement de la jachère pour la culture de céréales, mais cherche plutôt à augmenter le rendement des cultures, déjà utilisées pour la production alimentaire, *via* l'utilisation de fumier. Ces nouveaux systèmes de cultures vont présenter plusieurs avantages :

(i) l'utilisation du fourrage pour l'alimentation du bétail qui va donc pouvoir croître et contribuer à un enrichissement en matière organique des champs de culture.

(ii) le contrôle des phénomènes de lessivage et de dénitrification. Ces deux phénomènes peuvent être la cause d'une baisse de productivité des sols par des pertes de minéraux essentiels à la croissance des plantes. Le lessivage est l'action naturelle de l'eau dans le sol qui va s'écouler en profondeur et emporter avec elle les minéraux qui ne sont pas fixés. La dénitrification est un processus biologique microbien, en condition anaérobie, débouchant sur une réduction du nitrate disponible dans les sols en différentes formes d'azote dont certaines gazeuses ce qui conduit donc à une baisse de la fertilité. Dans une jachère, les plantes sont fréquemment pâturées et piétinées par le bétail empêchant un bon enracinement des plantes. Ceci peut avoir pour conséquence d'augmenter les effets de lessivage ainsi que la dénitrification (les sols tassés sont des sols où l'oxygène est moins disponible, favorisant ainsi la dénitrification).

Grâce au fumier et aux engrais verts produits par ce nouveau système agraire, le sol est beaucoup plus riche en matière organique que par le passé, permettant un enrichissement en humus, une meilleure structuration du sol et une meilleure retenue de l'eau et des minéraux fertilisants. Les jachères ne sont cependant pas totalement abandonnées mais leur utilisation dans ce nouveau système est extrêmement réduite. En un siècle, 75% des jachères vont être mises en culture.

Alors que le passage d'une culture attelée légère à une culture attelée lourde n'avait pas permis une forte augmentation du rendement, les rendements céréaliers vont doubler avec le système agraire sans jachère, pour atteindre en moyenne entre 8 à 12 quintaux à l'hectare (Mazoyer and Roudart, 2006). Mais la production de céréales n'est pas la seule à profiter de cette embellie. En effet, les productions de viandes mais aussi de lait sont aussi en hausse. Ce qui a pour conséquence directe une augmentation de la ration calorique moyenne pour la population et un recul non négligeable des grandes famines, qui disparaissent dès la fin du XVIII^{ème} siècle en Europe.

Mais cette première révolution agricole ne s'est pas développée de façon égale dans toute l'Europe. Dans le Sud et l'Est de l'Europe, cette révolution s'est très peu développée, avec un fort maintien d'un système agraire avec jachère. Cette révolution agricole à deux vitesses en Europe coïncide avec de grands bouleversements sociaux en Europe. En pleine Renaissance et siècle des Lumières, beaucoup de pays, la France en tête, entament une révolution sociale majeure qui tente d'instaurer le principe de la démocratie. Des lois vont être votées et vont permettre le développement du système agraire sans jachère, l'abolition du droit de '*vaine pâture*' et de la jachère obligatoire permettant la propriété privée des terres agricoles et leur usage exclusif par les agriculteurs, et la redistribution des terres. L'industrie et ses nouvelles capacités vont également apporter des solutions pour augmenter l'efficacité du système agraire : c'est le début de la mécanisation de l'agriculture.

B.5 Evolution de l'Agriculture durant l'Epoque Contemporaine

Le système agraire sans jachère, malgré sa performance notable, présente les limites d'être très coûteux en temps, du fait de l'investissement en main d'œuvre nécessaire. Avec la révolution industrielle, de nouveaux outils ayant pour objectif de mécaniser l'agriculture ont été mis au point. Parmi les machines développées, la plus emblématique est la moissonneuse à vapeur, qui intégrera par la suite le battage et deviendra la moissonneuse-batteuse. Cependant, l'utilisation de ces machines n'était possible que dans les grandes exploitations agricoles. Or en Europe, le modèle d'exploitation familiale prédomine, contrairement aux régions colonisées au cours des derniers siècles comme le Canada, l'Argentine, les Etats-Unis ou l'Australie. Du fait d'un peuplement récent et de la grande taille des exploitations, les nouvelles machines agricoles tournent à plein régime dans ces pays pour compenser une main d'œuvre peu nombreuse. Une augmentation de la productivité agricole et des

surplus de production y est alors observée. Ces nouveaux pays vont envahir le marché européen de denrées produites à des prix très concurrentiels. Pour la première fois depuis le début de l'agriculture, les différents systèmes de production agricole vont entrer en concurrence *via* le développement du commerce permettant l'acheminement rapide des produits. Ceci entraîna des bouleversements stratégiques de production des denrées agricoles dans certains pays européens (Mazoyer and Roudart, 2006) :

(i) Le Royaume Uni, alors à la pointe de l'agriculture, pratique le libre-échange et fait le choix de sacrifier son agriculture au profit de son industrie. Il importe donc massivement des denrées de bases à bas prix provenant du Nouveau Monde, basculant dans une dépendance alimentaire, et voit sa population agricole chuter drastiquement.

(ii) D'autres pays, comme le Danemark, font le choix d'investir davantage dans les denrées périssables afin de les exporter sur le marché européen. Ils deviennent alors moins assujettis à la concurrence des pays du continent américain.

(iii) Un pays comme la France fait le choix de taxer davantage les produits de l'importation afin de favoriser son agriculture, du fait de sa population agricole très forte (environ 50%).

La concurrence commerciale a donc créé une crise agricole, face à laquelle chaque pays, en fonction de ses forces et faiblesses, a répondu en favorisant certains secteurs agricoles et/ou industriels. Parallèlement, l'essor de l'usage des machines agricoles en Europe va amener à une diminution progressive de la main d'œuvre agricole et la disparition des petites exploitations (Zanden J. L. Van, 2008).

Grâce à l'essor de l'industrie, **la Deuxième Révolution Agricole** va permettre à l'Agriculture de devenir très performante. Les machines à traction animale vont être peu à peu remplacées par des machines à moteur à explosion (Mazoyer and Roudart, 2006). Les systèmes de traite vont être également de plus en plus automatisés. A partir des années 1950, l'évolution de ces machines va être rapide (augmentation de la puissance des moteurs, passage des machines de 2 à 4 roues motrices plus efficaces dans les terrains agricoles, etc). Mais leur coût est important. Comme lors de la première révolution agricole, les agriculteurs capables de dégager des profits de leur exploitation vont pouvoir investir dans ces machines, permettant un accroissement de leurs revenus, tandis que les petites exploitations, pas assez compétitives, finissent par disparaître. Alors qu'au début du XXème siècle, la production est très majoritairement une poly-culture-élevage, les exploitations vont se spécialiser pour gagner en rentabilité, au fur et à mesure de la moto-mécanisation. En parallèle de ces avancées

techniques, trois autres révolutions ont eu lieu : (i) l'utilisation d'intrants chimiques, déjà utilisés par le passé mais qui à partir de cette époque s'est généralisée, (ii) la sélection variétale des plantes afin de sélectionner des variétés capables de fournir les meilleurs rendements dans ces nouvelles conditions de culture, et (iii) la sélection des animaux domestiques visant à améliorer la production de denrées utilisées par l'Homme (lait, viande, laine...).

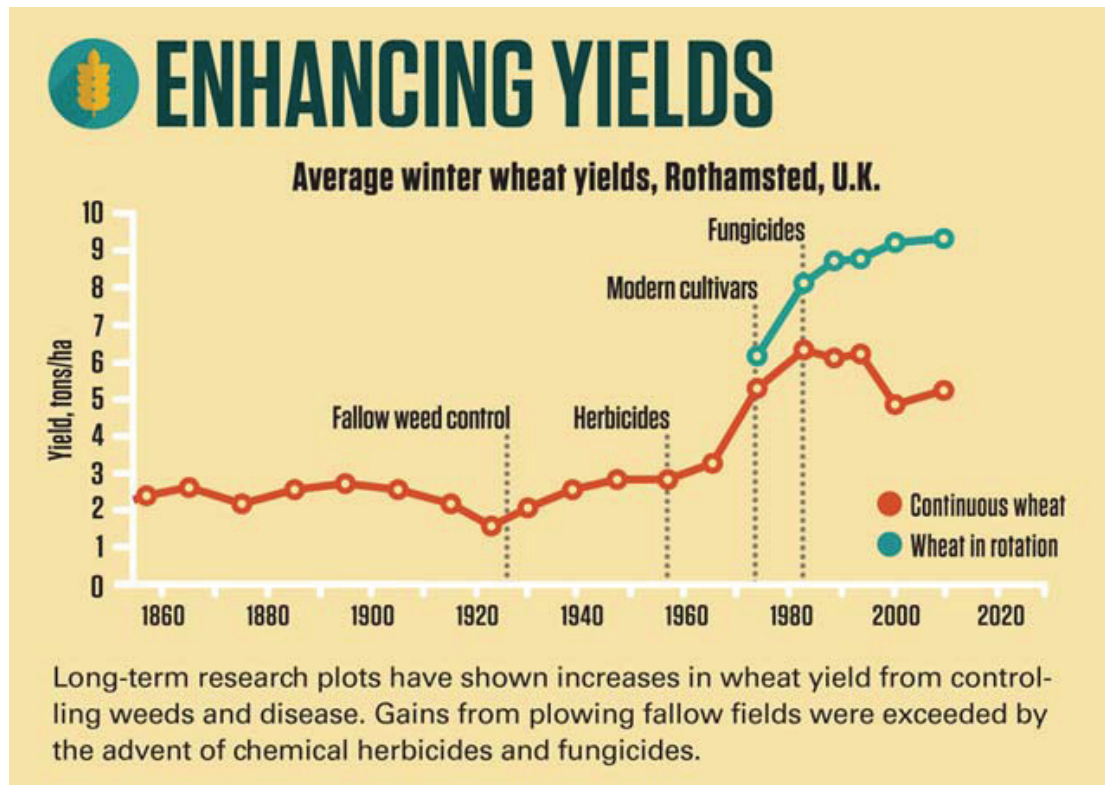


Figure 2 - Exemple de l'évolution des rendements de blé dans une ferme pilote du Royaume-Uni entre 1850 et 2010.

Une stabilité autour de 2 à 3 tonnes par hectare est observée entre 1860 et 1960 avant l'apparition des pesticides puis des cultivars modernes qui a permis un accroissement notable des rendements. L'influence des pratiques entre une culture de blé continue (en rouge) et en rotation (en bleu) est présentée, montrant l'incidence positive de la pratique de la rotation sur le rendement. Tiré de l'infographie « Pesticide Planet » parue dans Science (Août 2013).

Toutes ces améliorations ont représenté la plus grande évolution en termes de productivité que l'Homme ait connue depuis le début de l'agriculture. Les rendements agricoles pour les céréales sont passés d'une capacité d'environ 10 quintaux à environ 50 à 100 quintaux à l'hectare (Figure 2, pour le cas du blé). Mais la moto-mécanisation a surtout permis d'accroître le nombre d'hectares cultivables par travailleur, passant de 10 hectares à environ 50 et 200 hectares (Bairoch, 1989). Cette augmentation a eu pour conséquence une arrivée massive de produits sur le marché agricole. Mais cette augmentation de productivité ne s'est pas faite de manière égale dans toute l'Europe ; cette

deuxième révolution agricole a surtout profité aux pays qui étaient bien engagés dans la mécanisation de l'agriculture et qui ont bénéficié de la révolution industrielle. En effet, comme vu dans la partie précédente (B.4 Evolution de l'Agriculture durant l'Epoque Moderne), tous les pays de l'Europe ne se sont pas engagés dans la mécanisation par faute de moyen, et cette deuxième révolution agricole a creusé des inégalités en termes de production et de compétitivité. Les denrées alimentaires étant en plus grande nombre sur les marchés, leurs prix de revient ont donc baissé, diminuant ainsi les revenus liés à l'agriculture. L'exportation de l'excédent de production a joué un rôle dans la diminution des prix et la mise en concurrence des différentes agricultures en Europe et dans le monde. Comme vu précédemment, le marché nord-américain a envahi le marché européen avec des prix nettement plus compétitifs, qui ont poussé certains pays à ne s'alimenter que *via* des importations.

Une deuxième crise liée à la surproduction et la répartition inégale des rendements agricoles a donc vu le jour. A titre d'exemple, entre les agricultures des pays en voie de développement les moins évoluées et les agricultures de pointe pratiquées dans certains pays développés, le rapport de productivité peut être de l'ordre de 1 à 500 alors qu'il n'était que de 1 à 10 au début du XXème siècle. Les agricultures des pays en voie de développement ne permettent pas de dégager assez de revenus pour que les agriculteurs de ces pays sortent de la pauvreté. L'agriculture a donc, d'une certaine manière, façonné le monde économique et social d'aujourd'hui. Mais surtout, en plus d'une crise économique, la deuxième révolution agricole, par ses excès dans l'utilisation des sols, a entraîné une crise écologique sans précédent dans l'histoire de l'Homme.

Chapitre 2 - Conséquences écologiques de l'intensification de l'agriculture

A la sortie de la guerre, la population mondiale est de 2,5 milliards d'individus. A l'heure actuelle, la population est estimée à plus de 7,6 milliards d'individus¹. En 70 ans, la population a donc triplé. Cet accroissement sans précédent a pu être rendu possible grâce à l'augmentation des performances liées à l'agriculture et au progrès de la médecine, mais n'a pas été sans conséquence sur les écosystèmes.

La conséquence majeure de cette expansion de l'agriculture est une baisse globale de la biodiversité dans les écosystèmes terrestres et en particulier dans les écosystèmes agricoles (Jeanneret et al., 2003; Reidsma et al., 2006; Tilman, 1999). Plusieurs facteurs sont impliqués dans cette baisse de biodiversité.

A. Fragmentation du paysage agricole

L'agriculture intensive a conduit à l'homogénéisation et la fragmentation du paysage agricole (Jongman, 2002). En effet, les fermes se sont spécialisées dans l'agriculture ou dans l'élevage, ce qui a conduit à des régions entières dominées soit par des terres labourées, soit par du pâturage. Comme vu dans la partie précédente, les fermes de petites tailles n'ont souvent pas réussi à passer le cap de la moto-mécanisation. Le nombre d'exploitations s'est donc réduit, mais pas la superficie des terres cultivées (Harms et al., 1987) qui a elle doublé durant le siècle dernier (Houghton, 1994). Ce qui signifie que les exploitations restantes ont grandi en taille, réduisant la diversité des agricultures trouvées dans les paysages (Björklund et al., 1999). Pour agrandir leur unité de production, les fermes ont aussi colonisé les terres non cultivées et les ont transformées en terres cultivées (Ewers et al., 2009). Cette colonisation de nouveaux espaces a eu pour conséquence la perte d'habitats non-agricoles essentiels à la biodiversité comme les prairies, les forêts, les lisières de champs, et autres zones refuges. La perte de ces habitats, en plus d'homogénéiser les paysages, a conduit à une fragmentation des écosystèmes. La fragmentation d'un habitat correspond à son morcellement en une multitude d'habitats plus petits et séparés par des terres modifiées par l'Homme, rendant ainsi les interconnexions entre ces habitats plus complexes (Haddad et al., 2015). Dans le cas des systèmes agricoles, la fragmentation d'un habitat naturel peut être à l'origine de l'extinction des petites populations isolées (Tscharntke et al., 2005) et conduire à une baisse de la biodiversité. La baisse de diversité des oiseaux, liée à l'agriculture intensive et la perte des terres boisées, est l'exemple le mieux documenté (Donald et al., 2006; Radford and

¹ <http://www.worldometers.info/world-population/>

Bennett, 2007). Les insectes pollinisateurs (comme les abeilles) semblent aussi impactés par la fragmentation des habitats (Potts et al., 2010), de même que les amphibiens. En effet, les amphibiens présentent la particularité de posséder deux habitats distincts, un habitat terrestre et un habitat aquatique. La fragmentation des habitats va créer des barrières entre ces deux types d'habitat, ce qui va directement impacter ces populations, entraînant une baisse de leur diversité à travers le monde (Porej et al., 2004). D'autres études ont pu montrer l'effet de l'agriculture intensive sur la disparition d'habitats pour certains mammifères. En Argentine, dans la région de Pampa, l'augmentation des terres agricoles et la réduction consécutive des habitats naturels ont mené à une forte diminution des ongulés endémiques (le cerf de Pampa, le cerf de Marsh et le guanaco) (Medan et al., 2011). Les études portant sur les micro-mammifères comme le campagnol ou la souris sont plus mesurées vis-à-vis des effets négatifs de la fragmentation sur leurs populations. Si la plupart des études mettent en avant l'importance des haies et des bosquets pour le maintien de la diversité des micro-mammifères (Fitzgibbon, 1997; Michel et al., 2006; Panzacchi et al., 2010; Vieira et al., 2009), certaines espèces peuvent cependant tirer profit de la proximité des terres agricoles (Silva et al., 2005). L'intensification de l'agriculture aurait tendance, chez les rongeurs et musaraignes, à sélectionner des espèces avec des habitats généralistes plutôt que des espèces avec des habitats spécifiques (de la Peña et al., 2003). Les études sur les effets de l'agriculture sur les grands mammifères sont plus rares. Une étude menée sur les réserves naturelles en Tanzanie, dernier refuge pour les grands mammifères, tend à montrer que la taille de ses réserves influe sur leur survie (Newmark, 1996). Néanmoins, ces derniers refuges sont aussi la conséquence de l'expansion des terres agricoles aux dépens d'habitats naturels. La principale menace pour les grands mammifères est la déforestation (Kinnaird et al., 2003). Aux Etats-Unis, une étude sur les mammifères prédateurs comme les coyotes, les renards, les ratons laveurs ou les chats a montré qu'ils étaient capables de s'adapter à cette fragmentation grâce à leur mobilité (Gehring and Swihart, 2003), en évitant ou non les terres agricoles, qui restent pour ces derniers des terrains de chasse peu avantageux en raison du faible nombre de zones couvertes (permettant des stratégies de comouflage).

L'expansion des terres agricoles a donc augmenté le phénomène de fragmentation et de pertes des habitats, induisant des effets souvent négatifs sur les espèces présentes dans ces habitats naturels. Néanmoins, la réduction et la fragmentation des habitats ne sont pas les seuls responsables de la perte de biodiversité. L'usage intensif de pesticides et d'engrais a fortement impacté les écosystèmes. Et si la fragmentation des habitats n'a joué un rôle que sur les écosystèmes terrestres, les pesticides et les engrais vont également affecter les écosystèmes aquatiques.

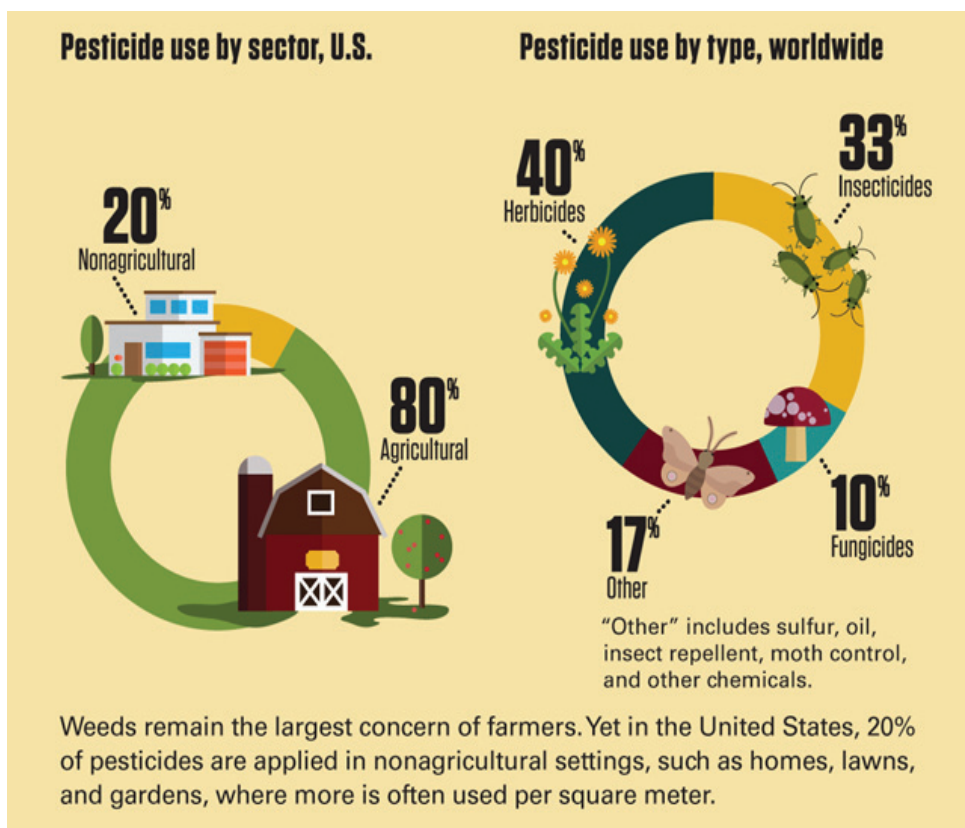


Figure 3 - Usage des pesticides aux Etats-Unis et répartition selon les familles de molécules concernées.
L'usage des molécules pesticides se fait principalement (80%) pour des applications en agriculture avec un marché dominé par les solutions herbicides (40%) et insecticides (33%). Tiré de l'infographie « Pesticide Planet » parue dans Science (Août

B. Impact de l'usage intensif des pesticides sur la biodiversité

Les pesticides ont connu un grand essor après la seconde guerre mondiale. Grâce à l'apport d'engrais, et le contrôle des pathogènes et des nuisibles, les rendements ont considérablement augmenté. Les Pesticides sont définis comme des produits de lutte contre les nuisibles animaux et microbiens (insecticides et fongicides), et contre les mauvaises herbes (herbicides) (Figure 3). Cette utilisation de produits chimiques a donc eu un impact positif sur la production agricole dans un premier temps, permettant une amélioration de la sécurité alimentaire, et *in fine* de la santé humaine avec une augmentation de la qualité de vie et de la longévité (Cooper and Dobson, 2007). Ces 20 dernières années, la demande en pesticides a atteint 3,5 millions de tonnes par an, représentant un marché avoisinant les 45 milliards de dollars (Pretty and Bharucha, 2015). Les chiffres sont encore plus élevés pour les intrants chimiques qui atteignent une consommation globale d'environ 110 millions de tonnes par an, représentant un marché de plusieurs milliards de dollars (Liu et al., 2015) (Figure 4).

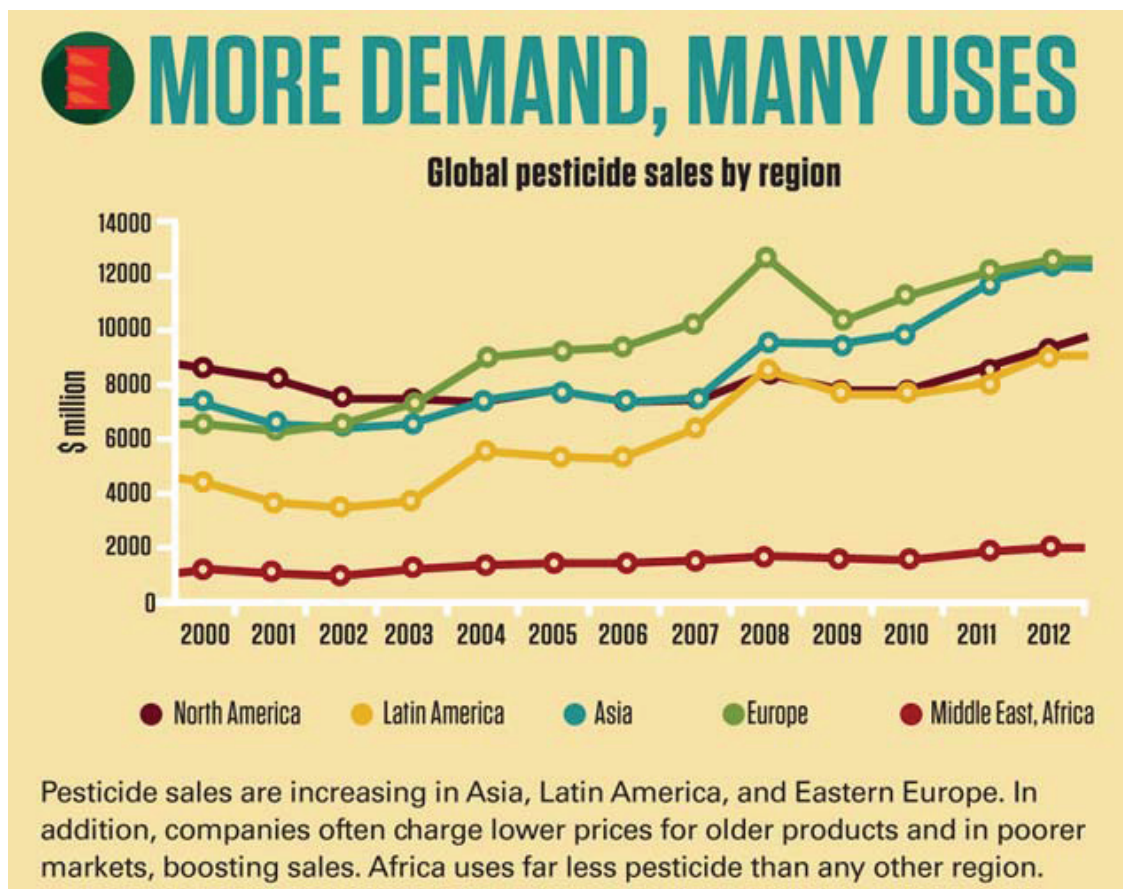


Figure 4 - Evolution du marché « Pesticides » entre 2000 et 2012.

Les ventes de pesticides sont globalement en augmentation quel que soit la région du monde concernée, excepté en Afrique où les ventes restent bien moins importantes que dans le reste du monde. Tiré de l'infographie « Pesticide Planet » parue dans Science (Août 2013).

B.1 Les fongicides et insecticides

Néanmoins, depuis le début des années 1960, des voix s'élèvent sur la dangerosité des effets secondaires de ces produits, et en particulier, Rachel Carson dans son livre « Le printemps silencieux » (Carson, 2002). Des études ont notamment mené à l'interdiction du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) aux Etats-Unis. Depuis, d'autres travaux ont montré les nombreux effets négatifs sur le long terme de ces produits (Geiger et al., 2010; Gibbs et al., 2009). Rachel Carson avait fait l'hypothèse que le DDT était un produit cancérigène et reprotoxique pour les oiseaux (le DDT conduisant à un amincissement de la coquille d'œuf, ce qui impacte négativement le succès reproducteur des oiseaux). Une étude canadienne a pu retracer sur plusieurs décennies l'effet du DDT et mettre en évidence que le DDT, en décimant également les populations d'insectes, avait conduit à une baisse de biodiversité des oiseaux insectivores (Nocera et al., 2012). Les pesticides peuvent donc affecter de façon indirecte des populations non cibles, en perturbant les relations trophiques au sein

des écosystèmes. De par leur nature, les pesticides sont souvent à large spectre d'action, touchant ainsi les populations ciblées mais aussi les populations non-ciblées. D'après une étude de Pimentel, seulement 0,1% de la quantité de pesticides utilisés atteignent leur cible (Pimentel, 1995). Deux populations sont particulièrement touchées par les effets des pesticides : les insectes, en particulier les insectes pollinisateurs, et les amphibiens. Parmi les insectes pollinisateurs les plus touchés, l'abeille est l'une des espèces les plus étudiées. Les pesticides, s'ils ne sont pas les seuls responsables de la chute de diversité des populations d'abeilles, ils y contribuent fortement (Goulson et al., 2015).

Dans certains habitats du Royaume Uni et des Pays-Bas, la diversité et le nombre d'abeilles a chuté de 60% (Potts et al., 2010). Les insecticides ont des effets létaux sur ces insectes (Doublet et al., 2015), mais aussi des effets non-létaux tout aussi néfastes comme, affecter la capacité à se reproduire, à capturer des proies, ou bien conduire à des développements morphologiques anormaux (Ndakidemi et al., 2016). Des études, s'intéressant à l'impact de la diminution de l'utilisation des pesticides, ont pu montrer un effet bénéfique de ces pratiques sur les populations d'invertébrés (Frampton and Dorne, 2007). De plus, les insectes ont une place importante dans les réseaux trophiques. Comme nous l'avons vu, leur déclin peut impacter la survie d'autres espèces dans l'habitat, en particulier les oiseaux (Benton et al., 2002). Des effets similaires des pesticides sont observés sur les amphibiens, induisant des comportements reproductifs anormaux (Smalling et al., 2015), une réduction de croissance ou une augmentation de la vulnérabilité à des pathogènes (Baker et al., 2013). Les études convergent donc toutes vers un impact négatif non négligeable de l'utilisation des pesticides sur la biodiversité animale.

En ce qui concerne la biodiversité des communautés microbiennes dans les sols et de celles associées aux plantes, deux types d'approches complémentaires sont utilisées pour étudier l'impact des insecticides et fongicides : une approche sur la diversité taxinomique et une approche sur la diversité fonctionnelle. Les nouvelles techniques de séquençage (NGS pour *Next-Generation Sequencing*) ont permis d'aller plus loin dans la caractérisation des communautés impactées, en augmentant la sensibilité des tests, par rapport aux méthodes de profilage utilisées auparavant comme la DGGE (pour *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ou la PLFA (pour *PhosphoLipid Fatty Acid*). La principale conclusion de l'ensemble des différentes études menées sur l'impact des pesticides est qu'ils sont responsables d'une baisse de la diversité des communautés microbiennes (Baćmaga et al., 2016; Jacobsen and Hjelmsø, 2014; Karlsson et al., 2014; Nettles et al., 2016; Sułowicz and Piotrowska-Seget, 2016; Zhang et al., 2016a). Les communautés peuvent cependant retrouver leur état d'origine (résilience) quelques semaines après le traitement aux pesticides (Prior et al., 2017). Les pesticides impactent aussi les communautés fonctionnelles et donc les activités des micro-organismes composant ces communautés (Gardeström et al., 2016; Martínez-Toledo et al., 1998; Riah et al., 2014;

Zhang et al., 2016b). Les pesticides semblent donc avoir un effet non négligeable sur la biodiversité dans les écosystèmes agricoles que cela soit à macro ou micro-échelle.

B.2 Les herbicides

Outre les fongicides et insecticides, les herbicides, produits dirigés contre la flore indésirable, sont actuellement les produits les plus utilisés dans l'agriculture moderne (Boutin et al., 2014). Ils sont utilisés dans l'éradication des mauvaises herbes qui peuvent perturber la croissance des plantes cultivées. Contrairement aux autres pesticides, les herbicides ne ciblent pas des organismes nuisant directement aux cultures, mais plutôt des organismes pouvant, de manière indirecte, nuire à la croissance des plantes. Les pertes de rendement estimées dues au non-contrôle de ces mauvaises herbes sont estimées à 20-40% (Oerke, 2006). Parmi les herbicides les plus utilisés à travers le monde se trouve le glyphosate. Son rôle étant d'éliminer les mauvaises herbes, la biodiversité végétale devrait être diminuée. Néanmoins, ces effets sur les espèces non-cibles semblent relativement faibles, comme l'indique la méta-analyse de Sullivan et Sullivan (Sullivan and Sullivan, 2003). Ces résultats semblent corroborer ceux de Egan et al. (2014) qui suggèrent que d'autres facteurs que l'application d'herbicides sont importants pour la distribution, l'abondance et la diversité végétales présentes dans un paysage agricole (Egan et al., 2014). Des conclusions similaires sont apportées dans la revue de Giesy *et al.* (Giesy et al., 2000). Mais d'autres études pointent du doigt une baisse de la diversité des plantes herbacées dans les cultures depuis les années 70 (Fried et al., 2009), correspondant aux années où l'utilisation d'herbicides s'est répandue. De plus l'étude de Hyvönen montre les effets négatifs de l'utilisation d'herbicides sur des espèces végétales, avec un gain de richesse et de diversité spécifique observé lors de l'arrêt de ces traitements (Hyvönen, 2007). Les avis sont donc assez divergents vis-à-vis de l'effet de ces produits sur la biodiversité végétale. Il en est de même concernant les effets de ces produits sur les populations d'insectes, d'invertébrés du sol, d'oiseaux, de mammifères et d'amphibiens. Dans la revue de Giesy *et al.* (2000) ou dans celle de Sullivan et Sullivan (2003), aucun effet direct de ces produits n'est reporté sur ces populations, mais les réductions de populations observées, chez les insectes par exemple, seraient dues à un changement de la végétation ayant suivi le traitement herbicide. Néanmoins quelques études et en particulier chez les amphibiens ont révélé des effets directs négatifs des herbicides envers ces populations (Relyea, 2005), contrairement à ce qui est mentionné dans la revue de Giesy et al. (2000). Comme précédemment, les avis sont divergents car les causes menant à une baisse de biodiversité peuvent être multiples et confondantes.

En ce qui concerne les communautés microbiennes, en se basant sur la revue de Giesy et al. (2000), les herbicides, et en particulier le glyphosate n'auraient pas d'effets sur la diversité des micro-organismes du sol ni sur leurs activités. Dennis et al ont obtenu récemment des résultats similaires

(Dennis et al., 2018). Mais de nombreuses études ont aussi montré une implication des herbicides dans la diminution de la diversité et de l'activité des espèces microbiennes (Crouzet et al., 2016; Cycoń et al., 2013; Darine et al., 2015; Kucharski et al., 2016; Newman et al., 2016). Ces différences de résultats peuvent être dues à la non-standardisation des protocoles d'évaluation des effets de ces produits ou bien au fait que les herbicides testés ne correspondent pas aux mêmes molécules, amenant à des conclusions contrastées.

Au-delà des effets potentiels sur la biodiversité, les fongicides, les insecticides et les herbicides sont aussi souvent décriés pour leur effet sur la santé des écosystèmes et humaine. De très nombreuses pollutions des eaux et des sols par ces produits ont été reportées ces dernières années, dans de nombreux pays (Ccanccapa et al., 2016; Chau et al., 2015; McKnight et al., 2015; Stone et al., 2014; Suk et al., 2016). Au-delà de leur effet direct sur la biodiversité, se pose la question de leur accumulation dans l'environnement et de leurs effets à long terme. En novembre 2017, l'Union Européenne a prolongé la licence d'utilisation du glyphosate, autorisant son utilisation pour au moins 5 ans de plus. Cette décision n'a pas faite l'unanimité au sein du parlement européen, et montre bien le débat existant autour de ces produits, qui ne repose pas sur un unique enjeu en agronomie, mais d'enjeux bien plus importants d'un point de vue économique, politique et sociétal.

Jusqu'à présent, nous avons vu que la biodiversité globale sur Terre était impactée par les activités agricoles en raison de la perte ou la fragmentation des habitats et de l'utilisation d'un ensemble de produits phytosanitaires dont les effets ne sont pas toujours très pleinement documentés.

Chapitre 3 - Quelles conséquences de l'agriculture sur les services écosystémiques

A. Les services écosystémiques : qu'est-ce que c'est ?

Le concept de services écosystémiques a vu le jour au milieu des années 1960 et s'intéresse aux services rendus à l'Homme par la nature. Le 'Millenium Ecosystem Assesment' (MEA ou Evaluation des écosystèmes pour le millénaire, en français) définit les services écosystémiques comme des bénéfices fournis à l'Homme par les écosystèmes. Les fonctions remplies par les écosystèmes sont multiples et variées et il est possible de les classer dans 4 catégories : i) des fonctions de régulation, ii) des fonctions d'habitat, iii) des fonctions de production, et iv) des fonctions culturelles (De Groot et al., 2002; Haines-Young and Potschin, 2010) (Figure 5). Le classement en fonctions est dépendant de l'Homme; c'est donc une vision anthropocène des écosystèmes qui s'applique dans ce cas-là.

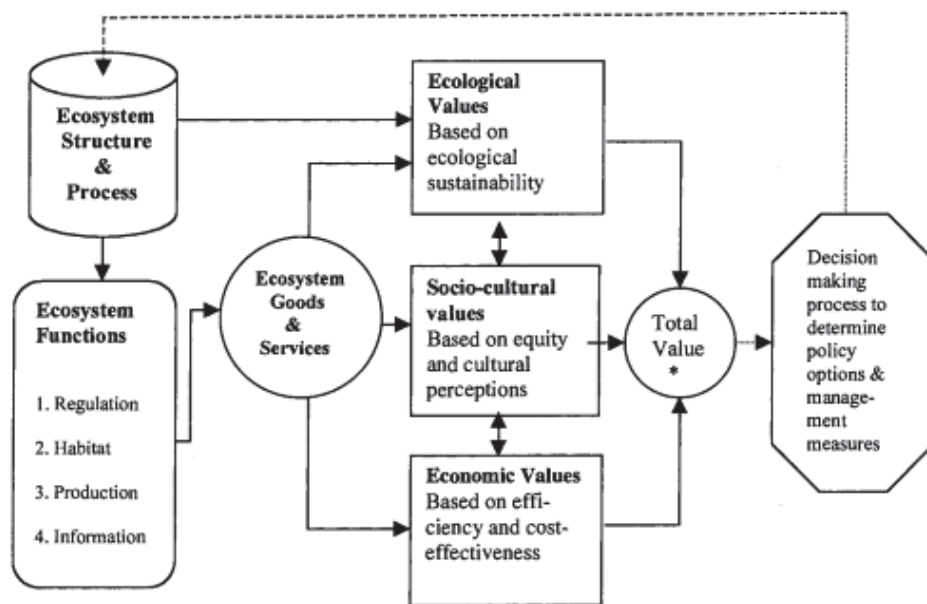


Figure 5 - Représentation des fonctions rendues par les écosystèmes et des valeurs écologiques, économiques et socio-culturelles qui peuvent en être retirées.

Illustration tirée de De Groot et al., 2002.

Une fonction de régulation est définie comme la capacité d'un écosystème naturel ou semi naturel de réguler des processus écologiques essentiels comme par exemple les cycles biogéochimiques. Ces fonctions peuvent être accomplies par différents organismes au sein de l'arbre du vivant. La régulation de ces fonctions permet des bénéfices directs ou indirects à l'Homme, impactant son quotidien. Une fonction d'habitat concerne la fourniture d'un habitat refuge et de

reproduction pour des espèces animales ou végétales et ayant un effet bénéfique sur leur conservation (biologique ou génétique). La fonction de production consiste en la création de ressources aboutissant à une augmentation de biomasse qui pourra être utilisable par l'Homme, aussi bien pour se nourrir, que pour construire ou créer. C'est une réserve d'énergie disponible et exploitable. La fonction culturelle est sans doute la fonction la plus anthropocentrée et elle concerne le côté récréatif des écosystèmes et le bien être psychologique qu'ils peuvent nous apporter aussi bien vis-à-vis de notre développement personnel que dans l'art ou la réflexion.

Ces services écosystémiques, fournissent de nombreux bénéfices à l'Homme et semblent donc importants à conserver. Néanmoins, la dégradation des écosystèmes par l'Homme a causé une diminution de la biodiversité d'un point de vue mondial (Butchart et al., 2010). Cette baisse de biodiversité peut influencer sur les services écosystémiques. En effet, la biodiversité est un acteur des services écosystémiques. Si elle est impactée, il devrait en être de même pour les services écosystémiques qui en dépendent. Les études dans ce sens ne manquent pas dans la littérature (Hooper et al., 2005). Néanmoins, il est difficile d'établir un lien direct entre une hausse de biodiversité et la qualité des services écosystémiques, estimée à l'aide de mesures sur des fonctions de l'écosystème telles que la productivité ou le cycle des nutriments (Haines-Young and Potschin, 2010). Benayas et al ont étudié l'efficacité de la restauration écologique sur la biodiversité et les services écosystémiques dans 89 travaux différents (Benayas et al., 2009). Si les données ont montré une augmentation de ces deux paramètres, respectivement de 44 et 25%, les restaurations n'ont pu atteindre les niveaux de biodiversité et de production de services écosystémiques atteints par les écosystèmes de référence, encore intacts. Les études concernant l'effet de la biodiversité sur les services écosystémiques sont souvent vues du point de vue de la restauration d'un écosystème : il est ajouté de la diversité à un habitat et les conséquences sont mesurées. Il est rare de dégrader un habitat pour mesurer les effets sur les services écosystémiques, donc d'avoir un point de référence qui soit volontairement dégradé.

La biodiversité est souvent assimilée à la richesse spécifique, c'est-à-dire au nombre d'espèces différentes. Mais la biodiversité ne concerne pas seulement la diversité d'espèces, mais aussi la diversité génétique et fonctionnelle. Toutefois, si nous nous intéressons aux services écosystémiques accomplis par les espèces, la richesse spécifique est un indice tout à fait approprié. Mais quand des indices de richesse spécifique sont donnés, ils ne prennent pas en compte l'importance de chaque espèce pour chaque écosystème. En effet, si une espèce clé de voûte - une espèce jouant un rôle primordial dans l'écosystème en dépit parfois de sa faible abondance (Mills and Doak, 1993)- vient à disparaître d'un écosystème, celui-ci sera très fortement impacté. A l'inverse, si une espèce ayant une redondance fonctionnelle dans l'écosystème, c'est-à-dire que d'autres espèces accomplissent la même

fonction au sein de l'écosystème, disparaît, l'impact peut être minime pour l'écosystème. Pour autant, la richesse spécifique sera impactée de la même manière. Ce qui signifie donc que les services écosystémiques seront impactés de façons différentes en dépit d'un nombre d'espèces présentes identiques.

Comme nous avons pu le voir, les services remplis par les écosystèmes pour l'Homme sont nombreux. Si ces services sont reliés à la biodiversité présente dans ces écosystèmes, et que les espèces composant cette biodiversité jouent un rôle bien défini, il est important d'identifier les différents acteurs d'un écosystème et leur rôle avant de prendre des mesures de préservation ou de restauration. Intéressons-nous maintenant à un écosystème particulier, l'écosystème agricole et les services écosystémiques qu'il peut rendre.

B. Les services écosystémiques dans l'agriculture

L'écosystème agricole est un habitat aménagé par l'Homme. Par conséquent, il n'est pas le fruit d'une succession écologique naturelle, et peut être considéré comme un habitat régulièrement perturbé par l'intervention de l'Homme, *via* des pratiques agricoles comme le labour ou la rotation des cultures ou bien l'utilisation de produits chimiques. L'écosystème agricole peut être considéré comme un habitat pauvre en biodiversité en particulier depuis l'expansion de l'agriculture intensive avec la monoculture et la diminution des habitats naturels que sont les haies ou les bosquets. Néanmoins, il n'existe pas un écosystème agricole mais des écosystèmes agricoles, en fonction de l'espèce végétale dominante. Ces écosystèmes agricoles sont destinés à fournir à l'Homme, nourriture, fibre et énergie (Power, 2010). Depuis le *Millenium Ecosystem Assessment*, les agroécosystèmes, en fonction du mode de management appliqué, ont été reconnus capables d'effectuer ces services écosystémiques (Power, 2010; Zhang et al., 2007). Les services écosystémiques rendus incluent, bien sûr la production de ressources, mais également la diversité génétique utilisée dans les cultures et l'élevage, la formation, la structuration et la fertilité des sols, ou le cycle des nutriments. Néanmoins, l'intensification de l'agriculture a eu un impact négatif sur la capacité des agroécosystèmes à produire des services écosystémiques (Matson, 1997).

Parmi les différents services écosystémiques des écosystèmes agricoles, nous allons nous intéresser plus particulièrement au rôle joué par la biodiversité dans le contrôle des nuisibles et des pathogènes qui affectent la productivité agricole. Les maladies liées à ces nuisibles ne sont pas sans conséquence sur différents services écosystémiques d'un agroécosystème. En plus de réduire la productivité des systèmes agricoles, diminuant donc un service écosystémique (celui de la production

de denrées pour l'Homme), les maladies ont des effets sur la formation des sols, le cycle des nutriments ou bien la productivité primaire. L'une des principales raisons est le non-remplacement des fonctions effectuées par les plantes. Lorsque ces fonctions ne sont plus effectives, le fonctionnement de l'écosystème est bouleversé (Cheatham et al., 2009).

Dans le cadre de l'agriculture intensive, la régulation des nuisibles et pathogènes a été peu à peu remplacée par l'Homme par l'utilisation des pesticides. L'utilisation des pesticides dans l'agriculture n'est pas nouvelle, et remonterait à bien des siècles avant JC, avant même que les causes des maladies soient connues (Russell, 2005). Mais au début du XIX^{ème}, des scientifiques ont pu établir une relation entre l'utilisation d'un produit chimique, le sulfate de cuivre, et la réduction de l'incidence d'une maladie, la carie chez le blé, causée par *Tilletia caries* (Russell, 2005). A cette époque, l'utilisation des pesticides est souvent empirique. Mais l'essor de l'utilisation des pesticides a connu un boom après la 2^{ème} guerre Mondiale, avec le développement d'une industrie chimique spécialisée dans la création de pesticides, où les molécules naturelles ont laissé la place à des molécules de synthèse. Comme vu précédemment, l'utilisation de ces pesticides n'est pas sans conséquence sur la biodiversité et la santé humaine. Mais leur utilisation n'est pas non plus sans conséquence sur l'évolution des populations de nuisibles :

- (i) Premièrement, l'utilisation répétée de produits chimiques peut conduire à une résistance des nuisibles à ces produits et, à terme, à une sélection de ces populations dans la nature et dans les agroécosystèmes (Thrall et al., 2011). Ces populations résistantes vont être capables de se multiplier et ravager les cultures. Pour des insectes, le temps d'adaptation est estimé à une dizaine d'années alors que pour les micro-organismes (bactéries et champignons) il est estimé à 1 à 3 ans (Tilman et al., 2002). Pour contrer les réponses adaptatives des nuisibles, l'industrie chimique met continuellement sur le marché de nouvelles molécules, mais des résistances multiples apparaissent, à l'instar de ce que nous pouvons retrouver en santé humaine avec l'émergence de pathogènes humains multi-résistants aux antibiotiques (Ferri et al., 2017)).
- (ii) Deuxièmement, l'action combinée de la perte/fragmentation des habitats et de l'utilisation de produits chimiques peut conduire à l'émergence ou la réémergence de nuisibles autrefois contrôlés naturellement par des populations naturelles qui, touchées par la baisse de biodiversité, ne peuvent plus accomplir ce rôle (Thrall et al., 2011). L'introduction d'espèces cultivées dans de nouveaux écosystèmes, accompagnées de leurs populations endogènes peut aussi favoriser l'émergence de nouveaux nuisibles (Jones, 2009).

Mais l'utilisation des pesticides n'est pas la seule responsable de l'émergence/la réémergence des nuisibles. La baisse de biodiversité s'applique aussi aux espèces qui sont cultivées. Avec l'avènement

de l'agriculture intensive et de la sélection variétale, la diversité génétique des espèces utilisées par les agriculteurs a considérablement diminué (Tscharntke et al., 2005). Cette baisse de diversité génétique peut influencer la résistance aux nuisibles (Hughes et al., 2008), en particulier dans le cas de monoculture (Mundt, 2002).

Les services écosystémiques sont d'une très grande importance pour l'Homme et son agriculture. Parmi ces services, le contrôle naturel des populations de nuisibles représente une fonction clé.

Chapitre 4 - Principales maladies fongiques du blé

A. Les principaux pathogènes fongiques du blé

Les céréales représentent la première denrée alimentaire produite dans le monde, ainsi que les cultures utilisant le plus de terres agricoles. Les principales céréales produites sont le riz, le blé et le maïs. De nombreux facteurs biotiques et abiotiques sont responsables de pertes agricoles. Parmi les facteurs abiotiques sont retrouvés des ressources limitantes dans les sols, le manque ou l'excès d'eau, des températures non optimales pour la croissance, ou des problèmes d'irradiations. Mais, 20 à 40% des pertes de rendements sont attribuées à l'heure actuelle à des facteurs biotiques (Savary et al., 2012). De 7 à 10% des pertes sont attribuées aux herbes invasives, de 8 à 15% sont attribuées aux animaux nuisibles (insectes, mites, nématodes, escargots et limaces, oiseaux, mammifères ou rongeurs) et 11 à 13% sont attribuées à des pathogènes (champignons, bactéries, virus) (Oerke, 2006). Parmi les 3 catégories de pathogènes, les champignons représentent les plus importants en termes de dégâts sur les cultures. Une étude, réalisée à l'aide de 495 phytopathologistes rattachés au réseau *Molecular Plant Pathology*, a permis d'établir une liste de 10 champignons pathogènes les plus dommageables, en fonction de leur importance scientifique et économique. Parmi ces 10 champignons, six sont des pathogènes des céréales dont un est une espèce modèle utilisée pour la compréhension des mécanismes de virulence, *Ustilago maydis* (Dean et al., 2012). Parmi ces 6 six pathogènes fongiques, 4 sont connus pour être particulièrement virulents sur le blé : *Puccinia* spp., *Blumeria graminis*, *Zymoseptoria tritici* et *Fusarium graminearum* (Singh et al., 2016).

A.1 *Puccinia* spp.

Les *Puccinia* sont responsables de maladies appelées les rouilles. Chez les céréales, trois espèces sont principalement retrouvées: *Puccinia graminis*, provoquant une rouille noire, *Puccinia striiformis*, provoquant une rouille jaune et *Puccinia triticina*, provoquant une rouille brune (Dean et al., 2012). *P. triticina* est la rouille la plus fréquente chez le blé (Bolton et al., 2008). Les *Puccinia* sont des champignons basidiomycètes, biotrophes obligatoires, ce qui signifie qu'ils tirent leur énergie uniquement de matière vivante. *P. triticina* est reconnu comme un pathogène important du blé, occasionnant des pertes de rendements significatifs sur une large aire géographique (Bolton et al., 2008). L'origine de *Puccinia* semble se situer dans la région de Croissant fertile au Moyen Orient et des références de rouilles sont rapportées dans des textes romains et grecs datant de l'Antiquité (Bolton et al., 2008). Au cours du dernier siècle, plusieurs épidémies à travers le monde ont eu lieu, que cela soit en Europe du Nord, en Australie, aux Etats-Unis ou en Asie. Néanmoins depuis les années 1980,

très peu d'épidémies majeures ont pu être notées (Leonard and Szabo, 2005). Contrairement à d'autres pathogènes des céréales, les *Puccinia* ne sont pas connus pour affecter la qualité des grains. Des cultivars de blé résistants ont été décrits, comme les cultivars Malkof et Webster, qui présentent de gènes de résistance (les gènes *Lr*) (Bolton et al., 2008).

A.2 *Blumeria graminis*

Blumeria graminis, un champignon ascomycète biotrophe obligatoire, est l'agent responsable de l'oïdium chez les céréales. L'oïdium se caractérise par l'apparition d'une poudre de couleur blanche à grisâtre à la surface des feuilles et des tiges. Ces infections vont réduire les rendements en grains. Le genre *Blumeria* est uniquement retrouvé chez les monocotylédones mais il existe d'autres agents de l'oïdium. Chez *B. graminis*, les sous-espèces sont strictement spécialisées pour un type d'hôtes. Par exemple, *B. graminis* f. sp. *tritici* a pour seul hôte le blé alors que *B. graminis* f. sp. *hordei* a pour hôte unique, l'orge (Wyand and Brown, 2003). L'ancêtre de *Blumeria* n'est pas encore connu, principalement du fait qu'il est le seul représentant des *Erysiphaceae* à avoir pour hôte des monocotylédones ce qui le rend éloigné génétiquement des autres espèces de cette famille. La manière dont l'ancêtre a pu passer des dicotylédones aux monocotylédones est encore inconnue (Takamatsu, 2013). Son aire d'origine pourrait être le Moyen-Orient, et il est possible, actuellement, de le retrouver partout sur la planète où ses différents hôtes sont présents. A l'heure actuelle, les fongicides représentent la première force d'action contre ces pathogènes, ainsi que l'utilisation de variétés résistantes (Dean et al., 2012).

A.3 *Zymoseptoria tritici*

Zymoseptoria tritici, champignon ascomycète, est responsable d'une des maladies les plus dévastatrices chez le blé, la septoriose (Eyal, 1999). La septoriose se caractérise par des nécroses sur les feuilles et des chancre sur les tiges. Ces nécroses vont réduire la capacité des feuilles à produire de l'énergie en réduisant la capacité de la photosynthèse (Orton et al., 2011). L'apparition de ce pathogène est liée aux premières domestications du blé dans la région du Croissant fertile, il y a 10 000-12 000 ans; ce pathogène serait issu d'un pathogène de graminées sauvages. Ce pathogène trouve des conditions optimales d'infection dans les climats tempérés. La dispersion de ce champignon (principalement sous forme d'ascospores, formes sexuées du champignon) est facilitée par les pluies et le vent, à l'automne. Si dans un premier temps, l'Europe a été particulièrement touchée par ce pathogène, des études récentes ont pu montrer que le problème devenait mondial (Orton et al., 2011). Le contrôle de ce pathogène s'effectue à la fois par des fongicides et des cultivars résistants. Comme

souvent, les fongicides se sont avérés inefficaces dans le temps, en particulier le groupe des fongicides QoI (strobilurines), ou bien les triazoles (Orton et al., 2011). Des cultivars résistants ont été trouvés et impliquent les gènes appelés *Stb*, qui sont au nombre de 13. Malheureusement, à l'heure actuelle, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore connus. L'étude des structures de population de *Z. tritici* révèle un fort taux de reproduction asexuée, mais aussi sexuée, une taille effective de population grande ainsi que l'existence de flux de gènes importants (Orton et al., 2011). Une taille effective de population correspond au nombre d'individus reproducteurs qui transmettent leurs gènes à la génération suivante et plus la taille effective de population est grande, plus la variabilité génétique au sein de la population peut être grande. Dans le cas de *Z. tritici*, une grande taille effective de la population est la conséquence d'une grande fréquence de reproduction sexuée (Orton et al., 2011). Ces différentes caractéristiques sont particulières à *Z. tritici* et ne sont pas retrouvées chez les autres pathogènes fongiques affectant les céréales, et pourraient lui conférer un grand avantage évolutif, permettant une adaptation rapide dans des conditions changeantes ou de stress comme suite à l'application de pesticides, ou l'interaction avec des cultivars résistants (Orton et al., 2011). Les deux mécanismes combinés pourraient expliquer la forte dispersion de *Z. tritici* ainsi que sa forte incidence sur les cultures.

B. *Fusarium graminearum*, l'agent causal des fusarioses

Fusarium graminearum (*Fg*) est un deutéromycète. Il fait partie d'un complexe d'espèces. Un complexe d'espèce regroupe des espèces phylogénétiquement distinctes mais qui ne peuvent être discriminées par des caractères morphologiques. Historiquement, le genre *Fusarium* semble s'être diversifié aux alentours de – 91 millions d'années, pendant le Crétacé. Le complexe d'espèces de *F. graminearum* n'est cependant apparu que plus récemment, il y environ 1 million d'années. Ayant évolué plus tardivement, ces espèces disposent par conséquent, à l'heure actuelle, de tous les caractères ancestraux des *Fusarium* (O'Donnell et al., 2013). Les données de biogéographie situent l'origine du complexe d'espèces de *Fusarium* au niveau de l'hémisphère sud et de l'Asie. De par le commerce des céréales et les changements climatiques, la dispersion de *Fg* a pu être facilitée en Asie, en Amérique du Nord et en Europe, entraînant la réémergence de la fusariose sur ces continents. Les différentes espèces au sein du complexe *Fusarium* semblent donc avoir évolué par spéciation allopatrique, c'est-à-dire que deux populations, initialement interfécondes, par isolement géographique ont donné deux espèces différentes. *Fg* est responsable de la fusariose chez les céréales et en particulier le blé, l'orge et le maïs. En France, les espèces *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées sur blé tendre, blé dur ou orge (Ioos et al., 2004). Cette maladie peut prendre différentes formes comme la fusariose de l'épi, maladie la plus

répandue, la fonte des semis ou bien la fusariose du collet. La fusariose des épis est provoquée par plusieurs espèces n'appartenant pas seulement au genre *Fusarium* mais également au genre *Microdochium* telle l'espèce *Microdochium nivale* (loos et al., 2004). *Fg* est présent sur tous les continents où le blé est cultivé (Wang et al., 2011). La fusariose a été découverte en 1884 en Angleterre, et est considérée comme l'une des maladies les plus destructrices du monde agricole au cours du dernier siècle. A titre d'exemple, aux Etats-Unis, entre 1998 et 2000, on estime que la fusariose a été responsable d'une perte de 3 milliards de dollars (Nganje et al., 2001). Depuis les années 1980-1990, il est observé une réémergence de *Fg*, qui est principalement due aux changements climatiques qui favorisent le développement de la maladie et qui ont pour conséquence des fréquences d'épidémies et des intensités de maladies plus fortes (Wegulo et al., 2015). Les causes des pertes de rendements sont multiples. Par l'infection des épis, *Fg* peut conduire à une stérilité des grains induisant instantanément une baisse de rendement.

Mais ce qui distingue *Fg* des autres pathogènes, c'est sa capacité à produire des mycotoxines qui vont s'accumuler dans les grains. Ces toxines vont être responsables de maladies chez l'Homme et l'animal. Les principales toxines retrouvées sont les tricothécènes, la zéaralénone et les fumonisines. Parmi les tricothécènes, les toxines les plus souvent retrouvées sont le déoxynivalénol (DON) et le nivalénol (NIV), découvertes dans les années 1970 (Pestka, 2010). Ces toxines, appelées aussi *vomitoxin*, sont responsables de vomissement chez les cochons à des doses de 19,7 ppm (partie par million) dans de la nourriture contaminée. Elles conduisent à des troubles intestinaux chez les animaux (Forsyth et al., 1977), mais peuvent aussi être associées à des gastro-entérites chez l'Homme. Ce sont des sesquiterpènes potentiellement inhibiteurs de la biosynthèse de protéines chez les eucaryotes. Elles sont souvent détectées dans les grains à de très hautes concentrations, variant de 2 à 93 ppm. Ces toxines, en particulier le DON, si leurs effets sur la santé humaine restent encore tout de même peu documentés, ont été détectées dans la nourriture de nombreux pays. Si l'effet sur des expositions aiguës est souvent étudié, très peu d'études s'intéressent à une exposition chronique. Une étude sur des cochonnets a mis en évidence des effets du DON et de la fumonisine sur la morphologie de l'intestin avec une atrophie et une fusion des villosités intestinales, une réduction de leur taille ainsi qu'une réduction du nombre de cellules caliciformes (cellules sécrétant du mucus) et des lymphocytes (cellules jouant un rôle dans le système immunitaire). Une exposition chronique à ces mycotoxines entrainerait donc une altération de l'intestin et prédisposerait les sujets porcins à des infections par des pathogènes entéro-gastriques (Bracarense et al., 2012). A notre connaissance, aucune étude sur des expositions chroniques sur l'Homme n'a été menée. A l'heure actuelle, la concentration maximale

autorisée pour le DON en Europe est de 0,5µg/g (ou 0,5ppm) de céréales, et aux Etats-Unis de 1µg/g (ou 1 ppm) dans les produits finis (Trail, 2009).

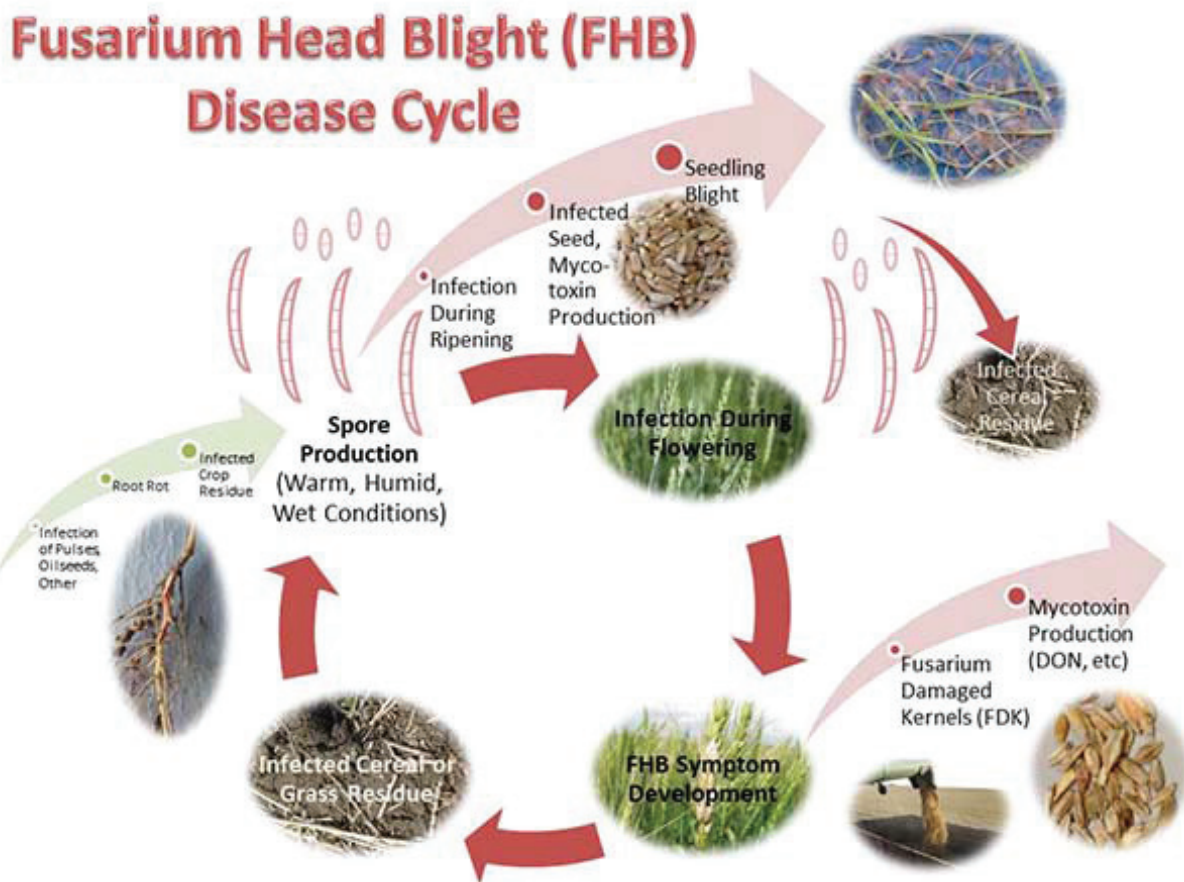


Figure 6 - Cycle d'infection de *Fusarium graminearum*.

Le cycle d'infection de *Fg* commence avec la présence d'hyphes fongiques dans les débris des végétaux (résidus de la culture précédente), qui vont être capables d'infecter les grains au moment du semis (fonte des semis) ou les racines des plantules, puis coloniser la tige (fusariose du collet). Puis, au moment de la floraison des épis, les spores, transportés par le vent vont être capable d'infecter le grain, et être responsables de la fusariose des épis et de la contamination des grains par les mycotoxines. Tiré du site internet du Gouvernement du Saskatchewan.

Ces toxines ont aussi un rôle dans le cycle de vie du champignon (Figure 6). Le premier inoculum fongique qui va infecter les céréales provient de débris végétaux contaminés par *Fg*. Au début du printemps, grâce à des conditions favorables, des températures qui augmentent couplées à un taux d'humidité croissant, il va y avoir un développement et une maturation des asques, organes renfermant les ascospores de *Fg*. Une fois arrivée à maturité, ces asques vont éclater et permettre aux ascospores de se disséminer à l'aide du vent et de la pluie, mais aussi des insectes, vers les plantes hôtes (Goswami and Kistler, 2004). Par la suite, les spores vont principalement infecter les blés par l'intermédiaire des épis. C'est pendant la période de l'anthèse, période durant laquelle la fleur est complètement ouverte et fonctionnelle, que les céréales sont les plus vulnérables à l'infection par des

spores de *Fg* (Goswami and Kistler, 2004). Une fois la spore déposée sur un épi, son processus d'infection peut commencer. Dans un premier temps, le développement des hyphes va avoir lieu sur la surface des épis en direction de structures permettant l'entrée du pathogène dans la plante, comme les stomates. Une fois le pathogène entré dans l'organisme, il va dans un premier temps avoir un mode de vie biotrophe et continuer sa progression entre les cellules végétales. Ce n'est que par la suite que *Fg* va pénétrer dans les cellules, conduisant à une mort cellulaire et des nécroses, et donc présenter alors un mode de vie nécrotrophe. Ces deux caractéristiques font donc de *Fg* un pathogène hémibiotrophe. Un mode de vie hémibiotrophe se caractérise par une longue période d'infection sans symptômes apparents suivie par une forte augmentation de la biomasse fongique consécutive à un fort épisode nécrotique (Kazan et al., 2012).

Différents mécanismes impliqués dans la virulence de *Fg* ont été décrits en fonction des tissus infectés par le pathogène. Les mycotoxines ne semblent pas être impliquées dans les premiers stades de l'infection mais au contraire, les gènes de biosynthèse du DON sont activés lors de la dispersion du pathogène des épis infectés vers les épis non infectés. Le rachis, axe central des fleurs disposées en épi, va en effet constituer une barrière à la dispersion du pathogène. Ce dernier va activer par conséquent la production de mycotoxines pour outrepasser cette barrière, mais les mécanismes sont encore aujourd'hui inconnus (Kazan et al., 2012). De même, *Fg* est aussi capable d'infecter le collet ou les racines, mais une fois encore les mécanismes mis en jeu lors de l'infection ne sont, à notre connaissance, pas encore connus. Néanmoins, chez une autre espèce de *Fusarium*, *Fusarium culmorum*, il a été démontré que les tricothécènes jouaient un rôle dans la capacité du pathogène à infecter le collet (Scherm et al., 2013). Mieux connaître l'interaction entre un pathogène et son hôte doit permettre de mieux identifier quels peuvent être les moyens de lutte contre ce pathogène et comment on peut améliorer leur efficacité.

Chapitre 5 - La lutte intégrée dans le contrôle de *Fusarium graminearum*

A. Notions d'IPM (*Integrated Pest Management*), la lutte intégrée contre les nuisibles

L'intensification de l'agriculture a conduit à une surconsommation de produits chimiques, que cela soit les engrais ou les pesticides. Si l'idée de produire durablement n'est pas nouvelle (Ehi-Eromosele et al., 2013), la prise de conscience du potentiel danger lié à l'utilisation de ces produits a conduit à l'émergence de nouvelles méthodes, en particulier dans la lutte contre les nuisibles. De ces nouvelles idées est née la notion de lutte intégrée vis-à-vis des nuisibles. La lutte intégrée doit permettre une gestion plus durable des agro-écosystèmes et moins polluante pour le futur, en réduisant l'utilisation des pesticides, tout en essayant de maintenir les rendements. La lutte intégrée repose sur 5 catégories d'actions complémentaires (Figure 7) : la prévention du risque lié aux nuisibles, le suivi des risques, la prise de décision quant à la solution à appliquer, l'action curative et l'évaluation du processus afin d'améliorer chaque action (Barzman et al., 2015). Les nuisibles sont aussi bien des mauvaises herbes, des insectes que des pathogènes. Par des actions combinées, les IPM visent à lutter non plus contre un seul nuisible mais à agir sur plusieurs fronts pour améliorer la protection globale de la plante cultivée. Les différentes pratiques liées à l'IPM sont très bien décrites dans différents revues et ne seront pas décrites avec plus de détails dans cette synthèse (Barzman et al., 2015; Ehi-Eromosele et al., 2013; Pretty, 2008; Vreysen et al., 2007).

Grâce à ces différentes pratiques, l'objectif est de réduire l'incidence des nuisibles (c'est-à-dire les maintenir à un seuil acceptable, sans chercher à les éradiquer complètement) en limitant l'utilisation des pesticides de synthèse, qui sont utilisés en ultime recours. Grâce aux IPM, la nature est remise au cœur de la lutte contre les nuisibles. Pour cela, des études approfondies sur l'écologie des nuisibles, sur la définition d'un seuil acceptable de présence des nuisibles, sur les stratégies de lutte sont nécessaires ainsi que la transmission du savoir acquis aux hommes de terrains mais aussi aux décideurs en charge de la politique agricole. Si les IPM présentent des avantages importants, comme la gestion durable des agrosystèmes et la réduction des risques liés à l'agriculture pour les écosystèmes et la santé humaine, ils ne sont pas sans désavantages. En effet, les programmes IPM demandent une grande connaissance du terrain d'application et un management de tous les instants, de l'identification d'un problème à l'application de la solution en passant par la prise de décision. Ceci demande un temps de travail sur le terrain beaucoup plus important, qui est à prendre en compte, car il peut avoir des

répercussions sociales et économiques sur les exploitations. De plus, les programmes IPM peuvent être dépendants des conditions climatiques sous lesquelles ils sont appliqués, n'assurant pas un succès garanti de ces pratiques (Ehi-Eromosele et al., 2013). Dans la partie suivante, nous allons voir quels sont les applications faites de ces IPM pour lutter contre *Fg*, pathogène modèle de ces travaux de thèse.

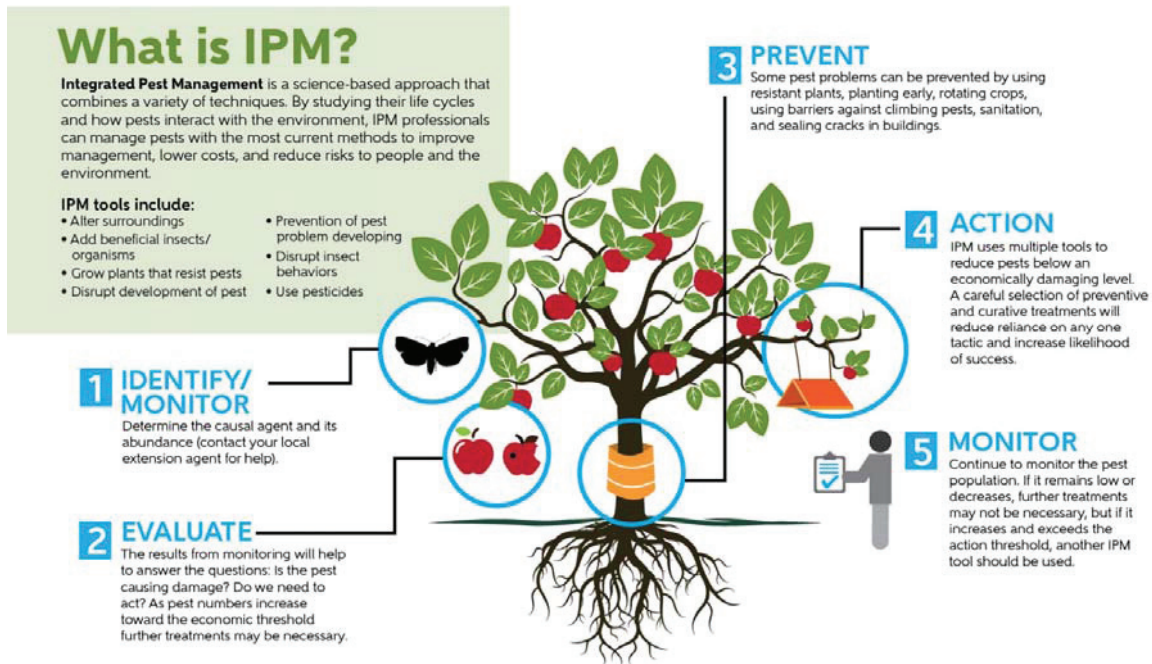


Figure 7 - Les différents pratiques de l'IPM.

L'IPM met l'accent sur la combinaison de pratiques visant à réduire l'incidence de nuisibles tout en respectant au mieux la santé humaine et environnementale. Dans cette image, les différentes actions complémentaires d'IPM sont décrites : prévention, suivi, prise de décision, action curative, et évaluation du processus. Ces 5 actions permettent d'améliorer le processus conduisant à réduire l'incidence d'un nuisible, autant en efficacité qu'en temps d'action. Tiré du site internet de the entomological Society of America (ESA).

B. Les moyens de lutte contre *Fusarium graminearum*

B.1 Les moyens de lutte actuels : pesticides et variétés résistantes

Les fusarioses ont une forte incidence dans le monde entier, et la raison majeure semble être le manque de moyens de lutte, car les méthodes actuelles sont peu efficaces. Les fongicides ont longtemps été utilisés en application foliaire (McMullen et al., 2012). Mais depuis une vingtaine d'années, les méthodes de traitement avec des fongicides ont évolué. Les nouveaux traitements vont cibler l'épi, au moment de la floraison (Edwards and Godley, 2010). Néanmoins, les effets restent tout de même contrastés (Blandino et al., 2006; Jones, 2000; McMullen et al., 2012) car les facteurs pouvant perturber l'efficacité de ces traitements sont multiples. Wegulo et al. ont étudié la réponse de

différents cultivars de blé d'hiver à l'application de pesticides (Wegulo et al., 2011). Ils ont pu montrer que des cultivars modérément résistants à la fusariose comme les cultivars Harry ou Truman avaient en présence de *F. graminearum* une meilleure réponse aux traitements pesticides que les cultivars sensibles comme Tomahawk ou Overley. D'après une étude de Simpson et al., en fonction du fongicide utilisé, les réponses du pathogène ne vont pas être les mêmes (Simpson et al., 2001). Par exemple, le Tébuconazole (famille chimique des triazoles) va être capable de contrôler les populations de *Fusarium* ainsi que les concentrations en DON mais pas l'Azoxystrobine (famille chimique des strobilurines), qui lui va être capable de contrôler d'autres populations pathogènes responsables de la fusariose de l'épi comme *Microdochium nivale*. Le moment d'application du fongicide est aussi important. La période la plus vulnérable pour l'entrée du pathogène dans la plante se situe au moment de l'anthèse. Néanmoins au champ, les périodes de développement des épis peuvent être décalées dans le temps, pouvant conduire à des difficultés vis-à-vis des périodes de traitement des cultures en fonction des conditions climatiques (McMullen et al., 2012).

Les blés ne sont pas sans défense contre *Fusarium*. Il existe des variétés plus résistantes que d'autres aux fusarioses et qui ont fait l'objet de recherches approfondies. Assez tôt au 20^{ème} siècle, l'importance de ces variétés a été reconnue et de nombreuses études ont été lancées pour répertorier ces variétés (Pirgozliev et al., 2003). En 1963, Schroeder et Christensen proposent de classer ces variétés résistantes en deux groupes : les variétés résistantes de type I qui sont capables de résister à l'infection initiale, et les variétés résistantes de type II qui vont être capables de résister à la colonisation de l'épi. Par la suite deux autres types vont être ajoutés, le type III regroupant les variétés qui vont être capables de dégrader le DON et ainsi empêcher son accumulation dans les grains, et le type IV regroupant des variétés tolérantes à de fortes concentrations en DON (Bai and Shaner, 2004). Le placement d'une variété dans l'une et/ou l'autre des catégories est défini par des tests en serre, où les modalités d'infection peuvent être contrôlées. En effet, l'évaluation en champ des résistances est difficile à établir, car les conditions environnementales peuvent influencer l'interaction entre les blés et le pathogène. Par exemple, la variété Sumai 3, une des variétés les plus résistantes, grâce à une résistance de type II efficace, peut présenter des signes d'infections multiples lors de fortes pressions parasitaires (Bai and Shaner, 2004). Dans le but de comprendre ces mécanismes de résistance, des études sur les gènes ont été réalisées. Dans un premier temps, les études se sont intéressées aux réponses à l'infection par *Fg* des gènes de défenses du type PR (Pathogenesis Related) en comparant des variétés résistantes et sensibles ou bien des mutants de blé dont les gènes de résistance ciblés ont été délétés ou mutés. Dans les deux cas, les gènes codant les protéines PR sont exprimés chez le blé, 6 à 12 heures après l'inoculation de *Fg*, atteignant un pic d'expression après 36h à 48h. Globalement, les variétés résistantes expriment plus rapidement et plus intensément ces gènes par rapport aux

variétés sensibles (Bai and Shaner, 2004). Mais malgré tout, ces réponses ne semblent pas être les facteurs clés de la différence de résistance à la fusariose entre les deux catégories de variétés. D'autres enzymes impliquées dans la défense immunitaire ont fait l'objet d'études afin de déterminer leur implication dans cette résistance comme la superoxyde dismutase, la catalase, la phénylalanine ammonium lyase, l'acide ascorbique peroxydase, ou l'acide ascorbique oxydase (Bai and Shaner, 2004). Les différentes études menées n'ont pas permis de mettre en avant un unique facteur clé responsable de la résistance de certaines variétés, avec des résultats contrastés observés pour ces différentes enzymes lors de l'interaction entre les différentes variétés de blés testées et *Fg*. La conclusion qui ressort de ces différentes études est que la résistance du blé vis-à-vis de la fusariose due à *Fg* est un phénomène complexe.

C'est pour cela que les études se sont tournées vers l'utilisation des nouvelles technologies et en particulier des techniques de puces à ADN permettant par des approches comparatives de mettre en lumière des gènes différemment exprimés entre deux conditions sur un grand nombre de gènes en même temps. Ces analyses ont permis de mettre en avant des QTL (*quantitative trait loci* ou en français des locus de caractères quantitatifs). Les QTL sont des régions d'ADN qui sont associées à un caractère quantitatif. Un caractère quantitatif est un caractère complexe dont la réponse correspond à une variation continue, et pour lequel plusieurs gènes vont intervenir pour un même caractère. Ces gènes peuvent être retrouvés dans tout le génome. Chez le blé, des QTL pour la résistance à fusariose ont été retrouvés sur tous les chromosomes, excepté le chromosome 7D. Un caryotype de blé est constitué de $n \times 7$ chromosomes. Le blé peut être diploïde ou polyploïde en fonction de l'espèce étudiée. Cette polyploïdie, correspondant au nombre de copies d'un même chromosome, peut varier de 4 à 6 copies. Les blés hexaploïdes sont le fruit de la domestication, ils n'en existent pas à l'état sauvage. La méta-analyse de Buerstmayr et al met en évidence trois QTLs qui sont les plus souvent retrouvés dans les variétés résistantes, et donc représentent potentiellement des QTLs stables permettant leur utilisation pour des croisements : le QTL *Fhb1*, localisé sur le chromosome 3B, le QTL *Qfhs.ifa-5A*, localisé sur le chromosome 5A et le QTL *Fhb2*, localisé sur le chromosome 6B (Buerstmayr H. et al., 2009). Le QTL *Fhb1* est considéré comme le QTL majeur dans la résistance à la fusariose. Il explique jusqu'à 60% de la variation phénotypique pour la résistance de type II (Gunnaiah et al., 2012). Il semblerait que *Fhb1* provienne de la variété Sumai 3 et son action semble être liée à l'accumulation de dix transcrits impliqués entre autre dans la biosynthèse de la paroi cellulaire et dans deux grands mécanismes généraux de défense (Jia et al., 2009; Rawat et al., 2016).

Si les connaissances sur les mécanismes de résistance sont encore peu nombreuses, cela n'a pas empêché les agronomes de tous les pays d'identifier des variétés résistantes et d'essayer de les croiser avec des variétés présentant d'autres intérêts agronomiques. En effet, les variétés décrites

comme résistantes présentent souvent peu d'intérêts agronomiques (petit épi, longue maturité...). Jusqu'à présent, peu de croisements ont été très concluants, excepté pour une variété, Sumai 3, qui comme vu précédemment, présente de très bonne capacité de résistance vis-à-vis de la Fusariose, et a fait l'objet de programmes de croisement en tant que parent résistant qui ont porté leur fruit (Bai and Shaner, 2004), particulièrement en Chine. Dans d'autres régions du globe, comme le Japon ou les Etats-Unis, d'autres programmes de sélection ont été développés, sans néanmoins atteindre des niveaux comparables de résistance et de rendement agronomique que les variétés hybridées avec Sumai 3, ce qui explique que la plupart des blés résistants sont issus de croisements avec cette variété (Bai and Shaner, 2004). Des croisements avec d'autres espèces proches de graminées résistantes, comme *Aegilops tauschii* (ou *Aegilops squarrosa*) n'ont pas été non plus concluants en raison de traits agronomiques obtenus non avantageux. Ainsi, Sumai 3 et ses dérivés restent toujours la meilleure alternative contre la fusariose à travers le monde, en particulier contre la dispersion des symptômes dans l'épi. A l'heure actuelle, les variétés résistantes semblent être l'une des meilleures alternatives pour lutter contre la fusariose. Néanmoins, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour réduire l'incidence de *Fg* sur les cultures.

B.2 Les pratiques de lutte intégrée sur *Fusarium graminearum*

B.2.1 Les pratiques agricoles

Parmi ces méthodes, les pratiques agricoles peuvent jouer un rôle non négligeable dans le contrôle de l'inoculum de *Fg* initial. Comme décrit précédemment, l'inoculum primaire de *Fg* est présent dans les résidus de cultures des années précédentes contaminés par *Fg*. Des pratiques culturales comme le labour sont des moyens de réduire cet inoculum primaire. En effet, en enfouissant les résidus des cultures dans le sol, le champignon va plus difficilement se multiplier. De plus, la dissémination des spores va être réduite car il est plus difficile à des spores de se disséminer quand elles sont sous terre. De plus, le labour peut avoir une action mécanique sur les résidus de culture, en les broyant et les disséminant. Ceci pourrait accélérer leur décomposition et ainsi réduire l'inoculum primaire. Une étude réalisée par Miller et al., au Canada, a pu montrer les effets du labour sur l'incidence de *Fg* sur 3 années (Miller et al., 1998). Alors que sur un champ non labouré, l'incidence de *Fg* était respectivement de 79%, 55%, et 46% sur les années 1, 2 et 3, elle n'a été que de 20%, 40% et 13% dans le champ labouré. Néanmoins, il est possible de noter que malgré une réduction de l'incidence, celle-ci reste assez variable au cours des trois ans, ce qui signifie que le labour à lui seul ne permet pas une efficacité constante et que d'autres facteurs vont jouer sur cette incidence.

B.2.2 La rotation des cultures

La rotation des cultures semble jouer un rôle non négligeable sur le contrôle de l'inoculum primaire. Des rotations avec des cultures non-céréalières permettent de diminuer l'incidence du pathogène au moment de la culture de céréales (Pirgozliev et al., 2003). En effet, les cultures non-céréalières et en particulier les légumineuses ne sont pas connues pour être des hôtes de *Fg*. Ce qui signifie que pendant cette période de rotation, l'inoculum primaire va diminuer. De plus, les débris végétaux laissés par ces cultures ne seront pas contaminés par *Fg*, limitant la pression parasitaire pour les cultures suivantes, contrairement à des rotations avec du maïs qui elles seront propices au développement du pathogène (Dill-Macky and Jones, 2000). Néanmoins, les rotations avec les légumineuses présentent un coût, car ces cultures rapportent moins et sont donc encore peu utilisées. Mais elles présentent pourtant l'avantage, en plus de diminuer l'inoculum primaire de *Fg*, de permettre au sol une régénération en nutriments (nutrition azotée) et donc un sol de meilleure qualité pour les cultures suivantes.

B.2.3 L'utilisation d'engrais et la limitation de la présence de mauvaises herbes

Parmi les autres pratiques agricoles, l'utilisation d'engrais semble avoir un impact négatif sur la protection des cultures. Martin et al. ont observé qu'une augmentation de l'application d'azote, d'une concentration de 70 à 170 kg N.ha⁻¹ augmente l'incidence de *Fg* dans le champ (Martin et al., 1991). Une étude similaire a été effectuée par Heier et al. qui ont conclu qu'une utilisation excessive de fertilisants à base d'azote peut augmenter le niveau de mycotoxines ainsi que la sévérité de la maladie (Heier et al., 2005). D'autres hypothèses peuvent être avancées comme une augmentation des ressources profitables au champignon ou bien l'influence de l'azote sur le potentiel hydrique de la plante, rendant plus susceptibles les épis à l'infection par le pathogène (Pirgozliev et al., 2003). Ainsi, la gestion fine des utilisations d'engrais peut permettre de limiter l'incidence du pathogène sur la culture. Les mauvaises herbes peuvent constituer des hôtes de *Fg* et donc des réservoirs. Si ces herbes sont retrouvées dans des champs de culture, elles peuvent avoir un impact positif sur le développement de *Fg* (Jenkinson and Parry, 1994).

B.2.4 L'irrigation

L'irrigation peut jouer un rôle dans la dispersion et l'incidence de *Fg* dans les cultures. En effet, le taux d'humidité est un facteur clé pour le développement de *Fg*. En absence de chutes de pluie, l'irrigation est le principal point de contrôle de l'eau dans le système agricole. Des pratiques d'irrigation visant à réduire le taux d'humidité à certains moments clés du cycle de culture du blé ont un impact positif sur le contrôle de *Fg*. Ces pratiques visent principalement à éviter les événements d'irrigation pendant

l'anthèse et les premiers stades de développement du grain, moment critique où l'entrée du champignon est favorisée (Wegulo et al., 2015).

B.2.5 L'utilisation de micro-organismes

B.2.5.1 Dans le contrôle de l'inoculum primaire

Pour lutter contre le développement de *Fg* dans le sol et sur les débris végétaux, des bactéries ou champignons peuvent être utilisés. Ces micro-organismes peuvent avoir plusieurs rôles : (i) accélérer la décomposition de la matière organique et donc limiter les supports sur lesquels les spores de *Fg* peuvent se maintenir, (ii) utiliser des ressources nutritives qui ne seront plus disponibles pour *Fg* donc au travers d'effets de compétition trophique, ou bien (iii) inhiber *Fg* via la production de composés antagonistes qui vont directement influencer la capacité de *Fg* à se développer (Bujold et al., 2001; Yuen and Schoneweis, 2007; voir p 64-65 et p113-114). Toutes ces pratiques visent à réguler l'inoculum primaire, c'est-à-dire ce qui se passe en amont de l'infection. C'est une première étape non négligeable pour réduire l'incidence de *Fg* sur les cultures, car plus l'inoculum primaire est limité, plus les chances d'épidémies sont faibles. D'autres méthodes visent à réduire les chances d'infections et de dispersion du pathogène dans la plante ou vers les autres plantes.

B.2.5.2 Dans la lutte biologique lors d'une infection par *Fusarium graminearum*

De la même manière que les micro-organismes peuvent être appliqués pour limiter la présence de *Fg* sur les résidus de culture, ils peuvent être utilisés en lutte biologique au cours de la culture du blé. Le biocontrôle (ou *Biological control*, lutte biologique) peut donc permettre de réduire l'utilisation de pesticides. En agriculture, le biocontrôle est souvent utilisé contre les insectes ravageurs de cultures avec l'utilisation de parasitoïdes ou de prédateurs naturels. Mais depuis quelques années maintenant, le biocontrôle s'intéresse aussi aux pathogènes microbiens des plantes. Et pour lutter contre ces pathogènes, des micro-organismes peuvent être utilisés, en particulier des bactéries et de champignons. Qu'ils soient utilisés vivants ou via l'utilisation de molécules qu'ils sécrètent, ces micro-organismes constituent ce qu'on appelle des agents de biocontrôle (Chandler et al., 2011). En effet, les micro-organismes, bactéries ou champignons, peuvent être capables de lutter contre les pathogènes microbiens, grâce à la production de métabolites secondaires ou des protéines (voir la revue 'Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies' au § VI), soit de manière directe par des effets d'antagonismes, soit par des effets indirects par la mise en place chez la plante d'une résistance systémique induite (ISR en anglais pour *Induced Systemic Resistance*) (Weller, 1988). Cette résistance, basée sur la reconnaissance de motifs bactériens de micro-organismes non pathogènes, va permettre une élicitation des défenses dans toute la plante et pas seulement au

point d'interaction. Cette élicitation des défenses va permettre une réponse plus rapide et plus forte au moment de l'infection par un pathogène (Conrath et al., 2001; Van Loon et al., 1998).

Parmi ces micro-organismes, les bactéries du genre *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lyzobacter* et *Streptomyces* ainsi que les champignons du genre *Cryptococcus*, *Clonosachys*, *Trichoderma* et *Aureobasidium* ont été décrits comme de potentiels agents de biocontrôle (Pirgozliev et al., 2003; Wegulo et al., 2015; Yuen and Schoneweis, 2007). Dans le cas où ils sont utilisés pour réduire l'incidence de *Fg* au niveau de sa dispersion dans les épis, ces BCA (*Biological Control Agent* ou agent de biocontrôle) sont appliqués directement sur les épis. Leurs effets ont aussi été montrés dans le cadre du contrôle de l'inoculum primaire en particulier pour *Clonosachys* (Xue et al., 2014).

Les BCA, par leurs modes d'action multiples, réduiraient les probabilités d'apparition de résistances chez *Fg*, constituant ainsi un atout majeur à leur utilisation par rapport aux autres moyens de lutte. Malheureusement, à l'heure actuelle, aucun BCA n'est enregistré et commercialisé spécifiquement contre *Fg* (Yuen and Schoneweis, 2007). De plus, dans les essais au champ, les résultats obtenus avec les BCA contre *Fg* ne sont pas très concluants et ne confirment pas les espoirs dans ces produits issus des tests en serre (Pirgozliev et al., 2003). Les raisons sont multiples. Certaines sont semblables aux problèmes rencontrés avec les pesticides : le moment de l'application des BCA doit être en adéquation avec le début de l'infection par *Fg*. D'autres raisons sont plus spécifiques de l'utilisation de micro-organismes comme par exemple l'établissement des micro-organismes dans leur nouvel habitat ou bien l'obtention des conditions nécessaires à la synthèse des métabolites responsables de leur activité de biocontrôle. De plus, en fonction de la variété de blé utilisée, la colonisation des BCA peut être différente ainsi que l'amplitude de leur effet (Jochum et al., 2006). Toutefois, des études ont pu montrer des effets positifs de l'utilisation combinée des pesticides et des BCA, qui permettait une amélioration de la protection (Wegulo et al., 2015).

Plus globalement, l'utilisation de microorganismes phytobénéfiques afin de développer des stratégies pour une agriculture durable et la compréhension des mécanismes de coopération que ces derniers peuvent établir avec d'autres micro-organismes et avec les plantes ont fait l'objet de la revue '*Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies*', parue dans *Environmental Science and Pollution Research* en 2018 et présentée ci-après.

Chapitre 6 - L'utilisation des coopérations microbiennes dans l'agriculture

Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies

Yoann Besset-Manzoni^{1,2} · Laura Rieusset¹ · Pierre Joly² · Gilles Comte¹ · Claire Prigent-Combaret¹

Received: 1 March 2017 / Accepted: 26 December 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The rhizosphere hosts a considerable microbial community. Among that community, bacteria called plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can promote plant growth and defense against diseases using diverse distinct plant-beneficial functions. Crop inoculation with PGPR could allow to reduce the use of pesticides and fertilizers in agrosystems. However, microbial crop protection and growth stimulation would be more efficient if cooperation between rhizosphere bacterial populations was taken into account when developing biocontrol agents and biostimulants. Rhizospheric bacteria live in multi-species biofilms formed all along the root surface or sometimes inside the plants (i.e., endophyte). PGPR cooperate with their host plants and also with other microbial populations inside biofilms. These interactions are mediated by a large diversity of microbial metabolites and physical signals that trigger cell–cell communication and appropriate responses. A better understanding of bacterial behavior and microbial cooperation in the rhizosphere could allow for a more successful use of bacteria in sustainable agriculture. This review presents an ecological view of microbial cooperation in agrosystems and lays the emphasis on the main microbial metabolites involved in microbial cooperation, plant health protection, and plant growth stimulation. Eco-friendly inoculant consortia that will foster microbe–microbe and microbe–plant cooperation can be developed to promote crop growth and restore biodiversity and functions lost in agrosystems.

Keywords Rhizosphere · Microbial cooperation · Microbial consortium · Microbial metabolites · Biocontrol · Sustainable agriculture · Cell–cell communication · Quorum sensing

Introduction

In the mid-twentieth century, the green revolution ensured food security to face the increasing world population, but it had negative impacts on the environment due to the intensive use of fertilizers and pesticides in ecosystems dedicated to agriculture and livestock. Anthropogenic impacts led to significant changes in communities naturally present in

ecosystems, in particular in the soil that contains diverse bacterial, archaeal, fungal, viral, and animal communities (Bardgett and van der Putten 2014). This soil biodiversity contributes to many ecosystem services, such as water storage, carbon sequestration, maintenance of the soil structure, plant productivity, or pest and disease suppression (Barrios 2007). Plant-associated microbial communities play a pivotal role in plant nutrient acquisition, in nitrogen and carbon cycling (Van Der Heijden et al. 2008), and also in helping crops tolerate biotic and abiotic stresses (Vacheron et al. 2015). Interactions among organisms are important for the good functioning of agrosystems. A second green revolution is currently on its way; it aims to maintain improved crop yields while using reduced levels of chemical inputs and water. In that respect, finding alternatives to the use of chemicals for plant disease control and plant growth stimulation and developing sustainable agriculture strategies are pivotal issues.

Plants are typically associated with a large diversity of microorganisms that can be defined as the plant microbiota. The plant and its leaf, root, and endophyte microbiota make up the

Yoann Besset-Manzoni and Laura Rieusset equally contributed to this work.

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Claire Prigent-Combaret
claire.prigent-combaret@univ-lyon1.fr

¹ UMR Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France

² Biovitis, 15 400 Saint Etienne-de-Chomeil, France

plant holobiont (Rosenberg and Zilber-Rosenberg 2016). As for other eukaryote hosts, microbiota are major drivers of host evolution by contributing to their growth, behavior, and adaptation to the environment. Inside the rhizosphere, i.e., the soil zone under the influence of plant roots, some root microbiota microorganisms, called plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), promote plant growth by improving plant nutrition (via siderophore production, phosphate solubilization, or nitrogen fixation), by modulating plant hormonal pathways (via auxin production, deamination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate), or by protecting plants against pathogens and parasites (Vacheron et al. 2013). In the latter case, PGPR are called biocontrol agents and can also protect plant health by eliciting induced systemic resistance (ISR) (Thomashow 2016). In addition, they can also interact with other plant beneficial rhizosphere microorganisms by improving the establishment of symbiosis between *Rhizobium* and *Fabaceae* and between mycorrhizal fungi and plants. *Rhizobia* and mycorrhizal fungi respectively supply nitrogen and phosphate to the host plants. In the latter case, PGPR are defined as mycorrhiza-helper bacteria (MHB) (Deveau and Labbé 2016).

In the rhizosphere, microorganisms benefit from 20% to 50% of photosynthetic carbon (Haichar et al. 2014) directly transferred by plant roots or released through mycorrhizal hyphal networks (Kaiser et al. 2015). In exchange for C input into the hyphosphere, mycorrhizal fungi retrieve iron, nitrogen, or phosphate resources from the soil surrounding plant roots (Finlay and Clemmensen 2017). If organisms differ in their nutrient needs, they will be unlikely to compete; as a consequence, cooperative interactions may be favored between partners, particularly within multi-species biofilms formed all along the plant root surface (Burdman et al. 2000; Couillerot et al. 2011).

Microorganisms indeed commonly live in biofilms formed in contact with surfaces or at the level of interfaces. A huge number of articles have demonstrated that cells inside biofilms are in a different physiological state than when they evolve as single planktonic cells (Prigent-Combaret et al. 1999; Nakamura et al. 2016; Reyes-Pérez et al. 2016). Cells are embedded inside an extracellular matrix that they collectively produced (Prigent-Combaret et al. 2000; Prigent-Combaret et al. 2012; Flemming et al. 2016). Sessile cells are usually (a) over-expressing genes involved in sessile biofilm lifestyle, such as exopolysaccharides and fimbriae, and (b) repressing the expression of genes involved in motile lifestyle, such as those encoding flagellae and chemotaxis components (Drogue et al. 2014). The close contact of cells inside these heterogeneous three-dimensional structures is conducive to exchanges of (a) nutrients and waste, (b) molecular communication signals (including quorum sensing (QS) molecules, antibiotics, cyclo-lipopeptides, and volatile organic compounds among others), (c) genetic material, and (d) physical signals (Flemming et al. 2007, 2016; Prindle et al. 2015; Humphries

et al. 2017). The rapid spread of signaling molecules among cells within biofilms facilitates biotic interactions among the different microbial components (Nadell et al. 2016). Gradients of nutrients, dioxygen, or metabolites established within these three-dimensional structures can lead to differential gene expression in the cells of the different biofilm parts. Clusters of cells performing the same function may be formed in biofilms. In this way, the labor achieved by the overall biofilm microbiota is divided between distinct microbial cell clusters (Watnick and Kolter 2000; West and Cooper 2016). Social relationships among cells in a biofilm can be compared to the functioning of social insects living in colonies. Social phenotypes play a major role in the spatial structuring of microbiota (Nadell et al. 2016). Indeed, microbial cells that produce public goods, i.e., compounds that are energetically costly to produce but pivotal for all cells, will typically have the best effects on their closest neighbors (Kreft 2004). From an evolutionary viewpoint, cooperative interactions might be promoted in biofilms and plant microbiota between cells producing public goods (e.g., extracellular enzymes, secondary metabolites like indole or antimicrobial compounds, siderophores, exopolymers, such as cellulose) and cells that do not produce them.

In this review, we address (a) the ecological significance of cooperative interactions between bacterial populations in the rhizosphere, (b) the role of cell–cell chemical and physical communication in root microbiota functioning, and (c) whether better knowledge of these issues can help design new strategies to better stimulate plant growth and protect plants against diseases and to develop novel relevant biocontrol products or biostimulants.

Social behavior in microbial communities

In all ecosystems, species coexist and maintain different interactions with one another. While social behaviors are widely known to play a major role for macro-organism fitness, only in the last decade has growing attention been paid to social behaviors in the microbial world (Crespi 2001). Social behaviors are indeed widespread in microbial life and involved in different types of biotic interactions (Damore and Gore 2012). They contribute to colonization of ecological niches by microorganisms, host infection, and invasion by parasites and pathogens, resistance to invaders, and cooperation.

Ecological significance of microbial cooperation

Cooperation involves at least two partners, i.e., a donor and a recipient that interact with each other, the interaction causing beneficial effects on the recipient, and positive or negative effects on the donor (West et al. 2006). Two types of cooperation can be differentiated (Fig. 1): (a) mutual benefits, with

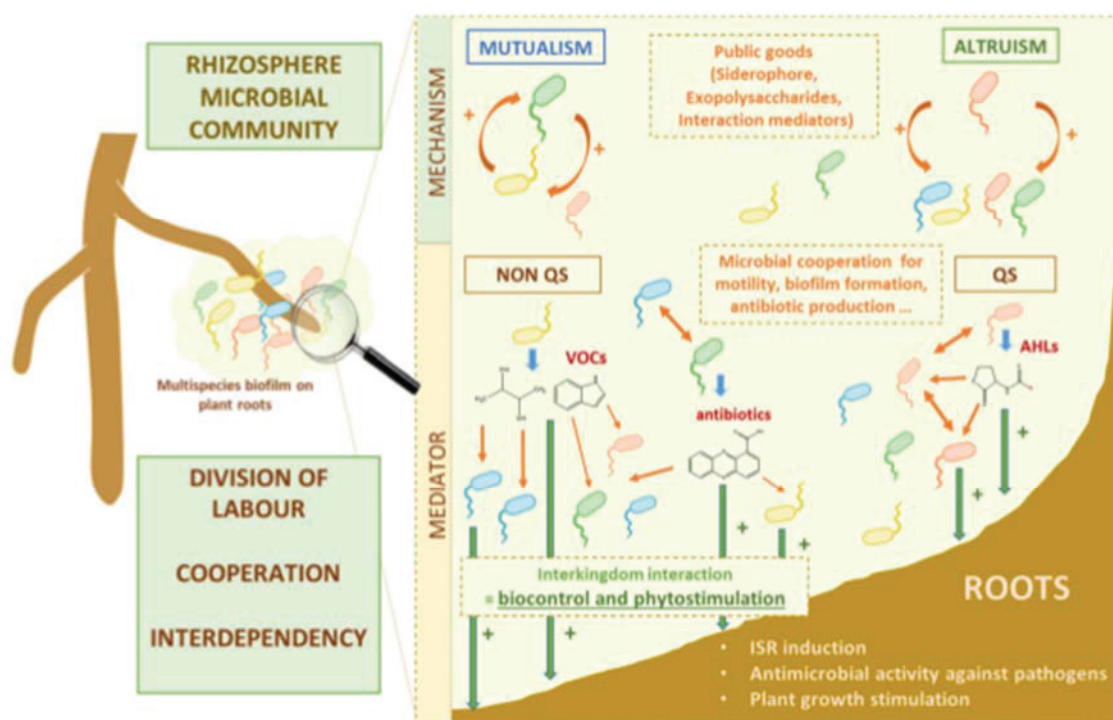


Fig. 1 Cooperation in the rhizosphere microbial community and role in host protection against disease and host growth stimulation. It appears that microbial plant protection cannot ensue from one multifunction biocontrol bacterial strain but may result from multi-function microbial consortia. The rhizosphere microbial community is a combination of several interacting bacterial populations (represented in yellow, green, blue, and red). Cooperation implies different mechanisms, such as mutualism (mutual benefits, with positive effects on both the donor and the recipient) and altruism (one donor produces “public goods” for the

community that will not necessarily benefit to it). These interactions control microbial behavior and may result in host plant protection and growth stimulation. Cooperation mechanisms involve many microbial compounds that act in bacterium/bacterium and plant/bacterium interactions. They can modulate bacterial behavior inside communities (biofilm formation, antibiotic production, motility ...) and can mediate inter-kingdom effects on host plants (e.g., increase ISR, promote plant growth)

positive effects on both the donor and the recipient, and (b) altruistic relationships, with positive effects on the recipient and negative effects on the donor (West et al. 2007a).

From an evolutionary viewpoint, cooperation involving mutual benefits is much more stable because this behavior promotes the fitness of both partners thanks to direct benefits for both the donor and the recipient. The mechanisms allowing for mutual benefits are divided into two groups: non-enforced cooperation (Leimar and Hammerstein 2010) and enforced cooperation (West et al. 2007b). As regards enforced cooperation, different mechanisms are involved, like reward, reciprocity, or punishment. These mechanisms are well-described among social insects (Ratnieks and Wenseleers 2008) but less so among microorganisms.

Symbiotic interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plants can involve reciprocal rewarding. Plants can detect the best fungal partners and reward them with more carbohydrates that benefit the fungi. In response, mycorrhizal fungi will increase nutrient transfer to plant roots (Kiers et al. 2011). Mutual rewarding permits convergence toward an evolutionary stable interaction between the two partners thanks to bidirectional control of the relationships. Mycorrhizal fungi

(MF) can also cooperate with bacteria on a reciprocity basis, particularly with bacteria able to solubilize phosphorus. The carbon released by MF can allow phosphate-solubilizing bacteria (PSB) to grow at their close proximity, leading to increased phosphorus availability to MF as a consequence of PSB population increase in the hyphosphere. When MF-inaccessible phosphorus is not limiting in the environment, PSB can strongly enhance MF hyphal growth, and thereby allow for beneficial reciprocity between the microbial partners (Zhang et al. 2016). Punishment can be involved in plant-microbe interactions. One powerful example is the relationship between non-fixing rhizobia and legumes (Denison 2000). If rhizobia happen to cheat by reducing the level of dinitrogen they fix in nodules, the plant will “punish” them: it will reduce their fitness by reducing the resources available to rhizobia from non-fixing nodules (Kiers et al. 2003).

In the case of altruism, the donor will ensure a service that is costly to self-produce and will benefit to recipients that do not produce it (Fig. 1). Some altruistic behaviors have been described in multi-cellular bacterial communities, especially in biofilms, like production of exopolysaccharides and cell-cell signaling molecules that can be considered as public

goods and are determining factors in biofilm formation (Kreft 2004). How can a behavior that does not lead to direct benefits to the donor be conserved by natural selection? To understand this feature, it is important to remember that microorganisms do not usually grow independently from one another in most environments: they evolve in biofilms that offer advantages to microbial populations, e.g., increased protection against abiotic stress and improved access to nutrients. Altruistic behaviors will ultimately lead to increased biofilm formation, a positive feature for both the donor and the recipient; that is why altruism might be compatible with natural selection. Programmed cell death is another example of altruistic behavior. Cell death can lead to the release of nutrients to the rest of the bacterial community. Under stressful conditions, bacteria control cell death of part of the population using toxin–antitoxin systems. Under non-stressful conditions, toxins and antitoxins bind to each other and inhibit the activity of toxins on their cellular targets, while under stress conditions, antitoxins are degraded and allow toxins to bind to their cellular targets (Allocati et al. 2015).

Division of labor in cooperative microbial communities

Division of labor is a common process in cooperative societies, such as those formed by social animals (anthills, beehives, etc.) and humans. It splits complex tasks within a community to make them simpler to perform by individuals or part of the community, and more efficiently at the whole community level (Fig. 1). In these types of organizations, individuals perform functions that are beneficial to the whole community. In microbial populations, division of labor may exist as observed for macro-organisms. Selection and evolution of cooperative relationships might be considered accordingly at the population or community levels, and not at the individual level as proposed by Nowak (2006). Nitrification is one example of division of labor in soils. It occurs in two stages: (a) nitritation corresponds to oxidation of ammonia or ammonium into nitrites and (b) nitrification corresponds to oxidation of nitrites into nitrates. These two essential steps in the nitrogen cycle are carried out by different microorganisms: (a) by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) (e.g., nitrosobacteria) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) for nitritation and (b) by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) (e.g., nitrobacteria) for nitrification (Ward 2013). Splitting the accomplishment of a functional process permits a better process rate, while completing a whole process provides for a better process yield (Costa et al. 2006). Nitrification was long thought to be necessarily performed by two types of functional groups, AOB and NOB, with the conclusion that natural selection had favored better nitrification rates than better yield. However, it recently turned out that certain bacterial populations are capable of accomplishing the full nitrification cycle (Santoro

2016). This new discovery raises important evolution and ecological questions.

Division of labor in a microbial community seems to be based on functional specialization of populations engaged in cooperative interactions. Vacheron et al. (2016) screened a collection of around 700 *Pseudomonas* rhizosphere isolates recruited by maize for the presence/absence of 18 plant-beneficial functions contributing to plant nutrition, hormone, and antimicrobial compound production. Bacteria were shown to belong to seven distinct fluorescent *Pseudomonas* subgroups, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas jessenii*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas chlororaphis*, and *Pseudomonas protegens*. They harbored a mean of 3.6 plant-beneficial functions, and no more than 9 functions. Therefore plants seem to favor the recruitment of bacteria with a limited number of functions in their rhizosphere. We can hypothesize that, a bacterium with few functions will be more productive for these given functions than a bacterium with many functions that would be less efficient in performing each of them. In addition, the distribution of plant-beneficial functions was studied among the seven fluorescent *Pseudomonas* sub-groups. For most of these functions, distribution was heterogeneous among subgroups: for instance, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) production was most prevalent in *P. protegens* and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase production was most prevalent in *P. corrugata*. This result suggests that *Pseudomonas* subgroups specialized in performing distinct functions. Bacterial specialization may strengthen cooperation between bacterial populations evolving in a same niche.

This feature echoes with the Black Queen hypothesis (Morris et al. 2012). This theory conceptualizes how selection can lead to dependence in microbial communities (Fig. 1). It started from the observation that, in co-evolutionary biotic interactions, such as mutualistic symbiosis, deletion of redundant functions in genomes is often observed, more particularly in endosymbionts. In bacteria, loss of genomic material is often associated with loss of functions. The theory indeed states that the functions lost by certain microbial populations in the community will be performed by other microbial populations in their vicinity, and these functions will be beneficial to them. Genome reduction is at the basis of this hypothesis: reduced genome size means fewer functions and specialization of tasks achieved by bacterial populations.

Coupling metatranscriptomics and metaproteomics to metagenomics may help to better understand how labor is divided between microbial populations in the rhizosphere, how populations cooperate with one another and with plants, and more widely the way microbes function within the niche (Smith 2001; Tanouchi et al. 2012; Wang et al. 2013).

Chemical and non-chemical signaling involved in the control of microbial cooperation, phytostimulation, and biocontrol

Many cooperative interactions take place in concert in the rhizosphere, i.e., both among microbial populations and between microbial populations and plants, and the sum of all of their impacts determines overall plant growth and health. Microbial interactions are mediated by a great diversity of metabolites. An estimated 17% to 42% of predicted ORFs in microbial genomes could be dedicated to their biosynthesis (Phelan et al. 2012). The rhizosphere is a zone with a huge diversity of molecules, such as cyclic lipopeptides, siderophores, quorum sensing molecules, and antibiotics (Keohane et al. 2015). Some of these compounds contribute not only to biocontrol effects but also to plant health protection (Venturi and Keel 2016). Some others are involved in microbial cooperation and contribute to inter-kingdom interactions (for instance between bacteria and plants, fungi, or nematodes) (Fig. 1) (Audrain et al. 2015).

The following section focusses on molecules involved in microbial cooperation in the rhizosphere that directly or indirectly influence plant protection against diseases and plant growth stimulation by the root microbiota. Cell communication involves mediators that induce signaling pathways and appropriate responses in the microbial or eukaryotic recipients.

Quorum sensing

Quorum sensing (QS) is the most common communication system in the bacterial world. It prevails in both Gram-negative and Gram-positive bacteria, and even in Archea. QS allows bacteria to monitor their density and to coordinate the expression of genes involved in basic bacterial functions, such as cell division or mobility. It can also regulate functions allowing bacteria to adapt to a given environment, like luminescence, virulence, production of extracellular enzymes and antibiotics, or biofilm formation (Elias and Banin 2012). This process is mediated by different small molecules and auto-inducers, such as *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs), small peptides, furan derivatives (auto-inducer system type II, AI-2), quinolones, butyrolactones, or unsaturated fatty acids (Table 1) (LaSarre and Federle, 2013).

One major QS mediator type: AHL

In Gram-negative bacteria like Proteobacteria, QS is commonly mediated by AHLs. QS systems are classically composed of a LuxI-family synthase that synthesizes the AHL signal. Then, AHL interacts at quorum concentrations with a cognate LuxR-family transcription factor and affects target gene expression

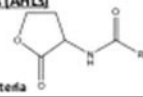

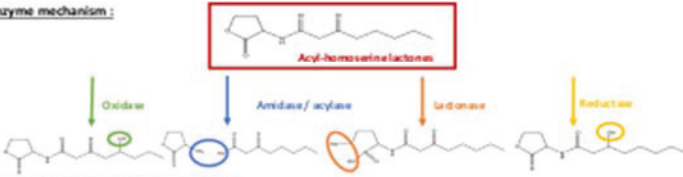


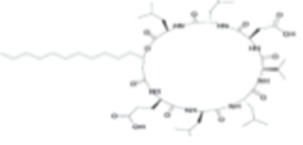


(Venturi and Fuqua 2013). AHLs are small molecules synthesized from *S*-adenosylmethionine; they differ among species according to the length of their acyl chain, the number of acyl groups, and the number of hydroxyl functions (Pierson 2000). Many soil and rhizosphere bacteria from the species *P. chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, and the genera *Burkholderia*, *Serratia*, *Erwinia*, and *Ralstonia* are known to use QS to control functions involved in rhizosphere survival and plant health protection or growth stimulation (Venturi and Keel 2016). AHLs are enriched in the rhizosphere, reflecting the high cell density and intensity of communication events occurring among microorganisms (Rosier et al. 2016).

AHLs are important for intra- and interspecies communication in the rhizosphere and also play a major role in biocontrol. They have an effect on biocontrol activities through the regulation of antibiotic production in *Pseudomonas* rhizosphere strains. For instance, phenazine antibiotics in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 and in *P. chlororaphis* PCL1391 are synthesized under the positive control of the LuxR-type regulator PhzR, which is activated by *N*-hexanoyl-homoserine lactone (HHL) (Haas and Keel 2003). AHLs may also have inter-kingdom action. Some are recognized by plant receptors and can modify plant gene expression. *Medicago truncatula* responds to AHL exposure by significantly changing the content of over 150 proteins (Mathesius et al. 2003). One third of the proteins differentially regulated in response to AHL treatment depends on AHL structure, especially on the lipid chain length. In addition, AHLs produced by PGPR can induce plant systemic resistance against pathogens, promote plant growth, and stimulate root system development (Venturi and Fuqua 2013; Hartmann and Rothballer 2017). For example, C10-HSL affects primary root growth, lateral root formation, and root hair development (Ortiz-castro et al., 2008). AHLs from the rhizosphere strains *Serratia liquefaciens* and *P. putida* also increase systemic resistance of tomato plants against the pathogen fungus *Alternaria alternata* by inducing salicylic-acid-dependent defense genes (Lareen et al. 2016; Schuegger et al. 2006). Bacterial AHLs also have an impact on certain fungi. For example, *Pseudomonas aeruginosa* 3-oxo-C12 homoserine lactone inhibited *Candida albicans* filamentous growth (Hogan et al. 2004). However, up to now, the effect of QS on mycorrhizal fungi has been poorly documented (Frey-Klett et al. 2011). Given the importance of QS in the rhizosphere, it would be innovative to better evaluate the role of AHLs on the control of root microbiota population networks and on plant stimulation and biocontrol in agro-systems.

Other QS mediators

Other compounds than AHLs can be involved in QS. For example, recent studies identified aryl-HSLs, α -pyrones, and

Table 1 Example of microbial compounds implicated in biocontrol and microbial cooperation

	Compounds	Signaling activity	Biocontrol activity	References
QS MEDIATOR	Acyl-homoserine lactones (AHLs)  Producer : Gram-negative bacteria	<ul style="list-style-type: none"> Cell division Mobility Biofilm production Virulence Luminescence Metabolite production 	Regulation of antibiotic production (e.g. phenazine) Promote ISR	Venturi and Fuqua 2013
	Diffusile fatty acid (DSF)  Producers : <i>Xanthomonas campestris</i> ; <i>Burkholderia cenocepacia</i> ; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<ul style="list-style-type: none"> Cell division Mobility Biofilm production Virulence Luminescence Metabolite production 	S. maltophilia biocontrol properties	Venturi and Keel 2016
QQ MICROBIAL MEDIATOR	Enzyme : - Lactonase - Reductase - Amidase - Oxidase QQ enzyme mechanism :  Producers : Bacteria, plant, fungi, mammalian	AHL degradation : modification of bacterial behaviour of both pathogen and PGPR strains. ⇒ Involved in biocontrol and cell-cell signalling		Granddément et al. 2016
ANTIBIOTICS	 DAPG : 2,4-diacetylphloroglucinol Producer : fluorescent <i>Pseudomonas</i>	<ul style="list-style-type: none"> Modification of metabolite production Biofilm formation Plant growth 	Antimicrobial activity against : - Bacteria - Fungi - Viruses - Helminths Promote ISR	Joussot et al. 2010 Combes-Meynet et al. 2011
	 Example of phenazine compounds : Phenazine nucleus Phenazine-5-carboxamide Pyoverdinin Phenazine-1-carboxylic acid Producers : <i>Pseudomonas</i> sp ; <i>Streptomyces</i> sp	<ul style="list-style-type: none"> Control of bacterial colony size Biofilm formation Iron chelation 	Antimicrobial activity against : - Bacteria - Fungi Example : - <i>Geosmithia</i> - <i>Fusarium oxysporum</i> Promote ISR	Price-Whelan et al. 2006
LIPOPEPTIDES	Cyclolipopeptide  Example of lipopeptides from soil bacteria : - <i>Pseudomonas</i> : massetolide A, putisolvin I and II, amphasin, - <i>Bacillus</i> : surfactin	<ul style="list-style-type: none"> Mobility swarming Biofilm formation and maturation 	Antimicrobial activity against : - Bacteria - Fungi - Oomycete - Viruses - Protozoa Example : - <i>P. syringae</i> - <i>P. infestans</i>	Raaijmakers et al. 2010 Ongena and Jacques 2008 Tran et al. 2007 De Bruijn et al. 2008
VOCS	 2,3 butanediol Acetoin	<ul style="list-style-type: none"> Biofilm production Motility Plant growth stimulation 	Promote ISR Example : protect plants against <i>P. carotovorum</i> May increase phenazine production in the rhizosphere <i>Pseudomonas</i> .	Ryu 2004 Audrain et al. 2015
	 Indole and its derivatives	<ul style="list-style-type: none"> Biofilm production Quorum quenching Motility 	Promote ISR Modify metabolite biosynthesis in host plants	Lee et al. 2015
	NO Nitric oxide	<ul style="list-style-type: none"> Biofilm dispersion Biofilm formation Plant growth stimulation 	Antimicrobial property Promote lateral root formation by <i>A. brasilense</i>	Audrain et al. 2015

dialkylresorcinols as chemical messengers from Proteobacteria, with similar mechanisms of action as AHLs. These compounds were evidenced in *Bradyrhizobium*, *Photorhabdus luminescens*, and *Photorhabdus asymbiotica*, respectively (Brameyer et al. 2015).

Another class of QS molecules in Gram-negative bacteria are diffusible fatty acids (DSF) produced by rhizosphere species, like *Burkholderia* sp. and *Stenotrophomonas maltophilia* (Venturi and Keel 2016). *S. maltophilia* can produce antifungal compounds like maltophilin (Jakobi et al. 1996). DSF-dependent QS in *S. maltophilia* regulates properties that can contribute to biocontrol, such as the ability to compete for nutrients and ecological niches (i.e., efficient root colonization, iron chelation). However, the way maltophilin production is regulated in *S. maltophilia* is still unknown (Alavi et al. 2013). Nevertheless, some bacterial strains belonging to *Burkholderia* sp. and *S. maltophilia* are opportunistic pathogens. Therefore, they cannot be used as biocontrol agents until proof is made that the selected strains belong to different clusters of strains from those of human pathogens.

The auto-inducer AI-2 is another mediator that mediates interspecies communication (Waters and Bassler 2005). AI-2 synthase is present in genomes of both Gram-negative and Gram-positive species. Interspecies quorum sensing involving the AI-2 system not only is limited to interactions among bacteria but also occurs between bacteria and fungi (Elias and Banin 2012). Further research will have to be performed to determine whether interactions mediated by AI-2 could impact the biocontrol and phytostimulation properties of rhizobacteria.

Quorum quenching

QS plays key roles in cooperative interactions within the root microbiota and in regulating PGPR effects, especially in biocontrol, but it is also involved in the control of virulence gene expression in many bacterial pathogens. For example, virulence of the economically consequential plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* is modulated by QS AHLs (Faure et al. 2009). Inhibiting plant pathogen QS, also named quorum quenching (QQ), is a biocontrol strategy that recently emerged as powerful for sustainable agriculture development (Faure et al. 2009).

The QQ strategy involves various compounds with different mechanisms of action (Table 1). Enzymes like lactonases, reductases, oxidases, or amidases degrade or modify AHL chemical functions and thereby prevent QS. QS inhibitors (QSi) are molecules that can interfere with auto-inducer synthesis independently of direct modifications of their structures. They can have an antagonistic effect on auto-inducer receptors or can inhibit the transduction of auto-inducer signals (Hirakawa and Tomita 2013). These molecules may have a low environmental impact on agrosystems as compared to

chemical pesticides currently used in crop cultures (Grandclément et al. 2016). QSis are produced by bacteria, fungi, or animals, but the main source of natural QSis is higher plants. Their chemical structures are diverse; up to now, no direct correlation has been established between QSi molecular structure and their targets in QS pathways (Grandclément et al. 2016).

Numerous bacteria present in the root microbiota can produce QSis or degrade/modify AHLs. For example, genera like *Bacillus*, *Delftia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, and *Ochrobactrum* can degrade *Pectobacterium* QS molecules. *Rhodococcus erythropolis* has recently been proposed as a biocontrol agent against *Pectobacterium*. *R. erythropolis* does not inhibit pathogen growth, but it efficiently prevents *Pectobacterium* QS signals from accumulating, thereby limiting its virulence (Barbey et al. 2013; Dessaux et al. 2016). Moreover, biodegradable products, such as γ -caprolactone and γ -heptanolactone, may be used to increase growth and root colonization of *R. erythropolis* populations in order to protect potato plants against *Pectobacterium* (Cirou et al. 2007). Host plants can also produce enzymes like lactonase to degrade QS mediators from pathogenic strains. Studies using transgenic potato and tobacco plants expressing the *Bacillus* lactonase synthase gene (*aiiA*) showed enhanced resistance to *Pectobacterium carotovorum* infection (Dong et al. 2001).

The efficiency of a given QSi molecule depends on the pathogen. As a consequence, the efficiency of QSis as biocontrol molecules has to be studied and characterized for each of the targeted pathogens (Grandclément et al. 2016). As QS communication is widespread in root microbiota bacteria and regulates directly or indirectly many diverse plant beneficial functions in PGPR, QQ may also have a negative impact on the positive effects of biocontrol driven by the root microbiota. Hence, elicitation of ISR by *Serratia marcescens* decreased in genetically modified plants that expressed the *Bacillus* lactonase gene *aiiA* (Ryu et al. 2013).

To conclude, QQ can be a powerful biocontrol strategy, but more studies are needed to identify its impact on the cooperative interactions between microbial populations within the root microbiota and plants in the field.

Signaling compounds that do not belong to the QS system

Antibiotic production in the rhizosphere

Antibiotics can be defined as a chemically heterogeneous group of small organic molecules of microbial origin that have deleterious effects on the growth or on the metabolic activities of other microorganisms (Thomashow et al. 1997). However, this definition gradually shifted over time: even if antibiotics may inhibit microbial growth or be implied in competitive interactions or in defense against predators (Jousset and

Bonkowski 2010; Keohane et al. 2015), they could be involved in intercellular signaling within microbial communities (Combes-Meynet et al. 2011). Similarly to a majority of biological metabolites, their activity is dose-dependent. At high concentrations, they can be a weapon against other bacteria, while at sub-lethal concentrations, they can have diverse other roles (i.e., control of biofilm formation, motility, biosynthetic pathways) in the bacterial world (Raaijmakers and Mazzola, 2012; Combes-Meynet et al. 2011; Couillerot et al. 2009). They also have inter-kingdom signaling effects on plants or ectomycorrhizal fungi and thereby can play a role in promoting plant growth (Brazelton et al. 2008; Jousset and Bonkowski 2010; Riedlinger et al. 2006).

Rhizobacterial strains can produce a great diversity of antibiotics (Table 1). This property is fundamental for their biocontrol potential. For example, PGPR belonging to the fluorescent *Pseudomonas* group can produce antimicrobial compounds, such as 2,4-diacetylphloroglucinol, phenazin, pyrrolnitrin, or pyoluteorin (Vacheron et al. 2016; Haas and Keel 2003). Other rhizosphere genera like *Streptomyces* or *Bacillus* also produce a wide range of antimicrobial compounds involved in their biocontrol properties (Traxler and Kolter 2015; Solanki et al. 2015).

Antibiotic production is influenced by microbial interactions (Rosier et al. 2016). Some antibiotics have a broad spectrum and allow bacteria to defend themselves against predators like bacterivorous nematodes and protozoa (Brazelton et al. 2008; Jousset and Bonkowski 2010). The presence of bacterivorous eukaryotes may enhance bacterial antibiotic production, which is energy-consuming and has to be adjusted according to the predation risk (Jousset and Bonkowski 2010). For example, the model predator *Acanthamoeba castellanii* induces antibiotic production by the biocontrol strain *P. fluorescens* Q2-87 (Jousset and Bonkowski 2010). The hypothesis formulated by Jousset et al. in 2010 is that bacteria perceive predators by sensing chemical compounds they excrete and respond to them by enhancing their antibiotic production.

2,4-Diacetylphloroglucinol

2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) is one of the most intriguing compounds synthesized by *Pseudomonas*. At high concentrations, this phenolic compound has a large spectrum of antimicrobial properties against bacteria, fungi, and helminths (Couillerot et al. 2009). However, at low concentrations, it also has signaling properties and allows cooperation between PGPR in the rhizosphere, leading to synergistic growth promotion effects on plants. At low concentrations, DAPG acts as a cell–cell communication signal that stimulates auxin production in *Azospirillum* and in turn wheat growth (Combes-Meynet et al. 2011). Moreover, it can have inter-kingdom signaling activity on plants by regulating the auxin biosynthesis pathway and altering root architecture (Brazelton

et al. 2008). Modulation of auxin production can hence have an impact on symbiosis between plants and ectomycorrhizal fungi (Deveau and Labbé 2016). On the other hand, auxin modulates the gene expression of *phlA* involved in the DAPG biosynthesis pathway and induces DAPG production by *P. protegens* strain CHA0 (de Werra et al. 2011). Antibiotic biosynthesis could be regulated by the presence of other antibiotics or rhizosphere mediators. For example, DAPG synthesis in CHA0 is repressed by metabolites, such as salicylate or pyoluteorin (Schnider-Keel et al. 2000).

Regulation of rhizobacterial antibiotic production by predators like *A. castellanii* could play an important role in biocontrol strategies. DAPG production was indeed strongly induced in the presence of amoeba supernatant, and DAPG appeared as a powerful toxin against amoeba (Jousset et al. 2010). However, increased DAPG concentrations may also play a role in biocontrol because they have an antagonistic effect on plant pathogens and can protect plants against them. Therefore, microbial interactions between *A. castellanii* and *P. fluorescens* might increase the biocontrol potential of PGPR. To conclude, the presence of amoeba in the soil can favor *Pseudomonas* biocontrol potential and rhizospheric bacterial cooperation (Jousset et al. 2010; Jousset and Bonkowski 2010; Weidner et al. 2016).

Phenazines

The phenazine molecular family gathers metabolites sharing a phenazine nucleus. It includes a large diversity of compounds whose activity and specificity differ according to the nature and position of substituents on the heterocyclic ring (Mavrodi et al. 2006). They are produced by a wide variety of bacterial genera, especially soil bacteria like *Pseudomonas* or *Streptomyces* (Zhang et al. 2015). Phenazines are important biocontrol molecules produced by rhizosphere bacteria, thanks to their antimicrobial activity against a large spectrum of microorganisms (Price-Whelan et al. 2006).

Phenazines produced by *Pseudomonas* spp. are much simpler than *Streptomyces* phenazines, with only carboxy- and hydroxy-substituted derivatives. They exhibit strong antifungal activity (Mavrodi et al. 2006). For example, phenazine-1-carboxamide (PCA) produced by *P. chlororaphis* PCL1391 controls tomato foot and root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* (Chin-A-Woeng et al. 2000). PCA is also active in vitro against *Gaeumannomyces graminis* and several other wheat root pathogens at concentrations as low as 1 µg/ml (Thomashow and Weller 1988). Moreover, phenazines are involved in induction of ISR in tomato and bean against *Botrytis cinerea* (Chin-A-Woeng et al. 1998).

Phenazine metabolites are key mediators of biocontrol, by both inhibiting plant pathogens and increasing plant defense

against pathogens. However, phenazine compounds are also involved in signaling mechanisms in bacterial communities and can regulate many phenotypes and functions in bacteria, like the size of bacterial colonies, biofilm formation, or iron chelation (Raaijmakers and Mazzola 2012; Keoghane et al., 2015). For example, altering the ratio of phenazine derivatives PCA and 2-OH-PCA produced by *P. chlororaphis* affects biofilm formation at different steps: (a) during initial attachment, (b) at the mature biofilm stage, and (c) at the biofilm dispersal stage (Maddula et al. 2008).

Lipopeptides

Lipopeptides (LPs) are composed of a lipid tail linked to a short linear or cyclic oligopeptide; in the latter case, compounds are called cyclic LPs (Raaijmakers et al. 2010). Their structure confers to them amphipathic and biosurfactant properties (Table 1). They are produced by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) from fungi and bacteria, including rhizosphere biocontrol strains from the *Bacillus*, *Streptomyces*, and *Pseudomonas* genera. Their large structural diversity is due to differences in the length and composition of their fatty acid tails, as well as in their peptide ring structure (Berry et al. 2010; Raaijmakers et al. 2006). These compounds share different biological functions, such as (a) motility, (b) attachment to surfaces, (c) antagonism, and (d) parasitism (Raaijmakers et al. 2010).

LPs from *Pseudomonas* and *Bacillus* PGPR are the most extensively studied, and a wide diversity of compounds has been reported (Ongena and Jacques 2008). They play a role in motility, biofilm formation, and biocontrol activity (Debois et al. 2008; De Bruijn et al. 2007, 2008; Kuiper et al., 2004). Root colonization and biofilm formation are indeed the first key steps permitting the efficient expression of biocontrol properties (Burdman et al. 2000).

Compounds like massetolide A or amphasin from *Pseudomonas* and surfactin from *Bacillus* are involved in bacterial cell aggregation and cell movement coordination during swarming (Raaijmakers et al. 2006; Debois et al. 2008). Other *Pseudomonas* LPs like arthofactin and putisolvin are also involved in biofilm formation and maturation (Roongsawang et al. 2003; Kuiper et al. 2004). The surfactant properties of putisolvin I and II influence the biofilm structure of the producing strains, but also their capacity to break down biofilms formed by other populations (Kuiper et al. 2004).

LPs also play a direct role in biocontrol owing to their antimicrobial properties. The biocontrol properties of *Bacillus* sp. against *P. syringae* in *Arabidopsis* sp. roots depends on surfactin concentrations (Bais et al. 2004). Protection of tomato by *P. fluorescens* against *Phytophthora infestans* is correlated with massetolide A production (Tran et al. 2007).

Volatile organic compounds (VOCs)

Volatile organic compounds (VOCs) are mostly small molecules with low molecular mass and high vapor pressure (Table 1). They belong to different chemical families, such as alkenes, alcohols, benzenoids, aldehydes, ketones, or terpenes (Audrain et al. 2015). Most microbial VOCs are considered as side products of primary and secondary metabolites and are still poorly studied (Venturi and Keel, 2016; Schmidt et al. 2015).

Volatile compounds are known to be involved in inter-kingdom interactions with plants, animals, or fungi, and they are essential for long-distance interactions in microbial communities (Audrain et al. 2015). Some of these volatile metabolites can act as signals and influence microbial behavior in biofilm formation, virulence, and stress tolerance. For example, nitric oxide (NO) at low concentrations can induce biofilm dispersal in a large number of bacterial species, like *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, or *Bacillus licheniformis* (Barraud et al. 2009). However, NO also induces biofilm production in a few species, such as in *Azospirillum brasilense* (Di Palma et al. 2013). This compound also plays a fundamental role in eukaryotic organisms. Several studies have reported its implication in plant growth (leaf expansion and root growth) and in the activation of plant defense responses (Dumer and Klessig 1999).

Certain volatile metabolites belong to the indole family (Blom et al. 2011). These compounds are signaling molecules involved in bacterial behavior and physiology, and host/bacterium interactions (Lee and Lee 2010; Lee et al. 2015). For example, indole modulates antibiotic resistance in *Escherichia coli*, *P. putida*, or *P. aeruginosa*, promotes biofilm formation in *Agrobacterium tumefaciens* and *Burkholderia unamae* strains, or on the contrary, inhibits biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* or *oleivorans* strains (Lee et al. 2015). Indole-derived compounds also interfere with QS in a few rhizosphere species like *P. chlororaphis* or *S. marcescens* (Hidalgo-Romano et al. 2014). In addition to their role in PGPR biofilm formation, they have an impact on plant growth and plant defense (Lee et al. 2015). Indole promotes root development in *Arabidopsis thaliana* by interfering with the auxin signaling machinery (Bailly et al. 2014). Moreover, plant auxins are indole derivatives; this reflects the determining role of indole in plant development (Lee and Lee. 2010). Indole and its derivatives have a large array of actions in the plant rhizosphere, so more studies are needed to get a better knowledge of their role in bacterial cooperation, plant protection, and plant growth.

Acetoin and 2,3-butanediol are other important volatile compounds produced by PGPR. For example, their production by *Bacillus subtilis* in the *A. thaliana* rhizosphere promotes ISR and helps protect the host plant against *P. carotovorum* (Ryu 2004). It is also important to note that

2,3-butanediol increases phenazine production in *P. aeruginosa* (Venkataraman et al. 2014). In light of this, it would be interesting to determine if this compound can increase phenazine production in PGPR. These two compounds were detected in PGPR strains that triggered plant growth promotion through VOC production, and exogenous application of 2,3-butanediol resulted in a dose-dependent stimulation of plant growth (Ryu et al. 2003).

Other VOCs are implied in biocontrol owing to their antimicrobial properties against fungi and bacteria. For example, *P. fluorescens* and *Serratia plymuthica* produce antimicrobial volatile compounds, like dimethyl disulfide, methanediol, and methanethiol acetate, which have a bacteriostatic effect on *A. tumefaciens* and *Agrobacterium vitis*, two broad-spectrum plant pathogens (Schmidt et al. 2015). The role and wide diversity of VOCs were recently highlighted in disease-suppressive soils (Cordovez et al. 2015). Most of them were produced by Actinobacteria belonging to the *Streptomyces* genus. They inhibited *Ralstonia solani* growth and promoted plant shoot and root biomass (Cordovez et al. 2015). Some VOCs modulate *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv biomass production and root system architecture, but their chemical structures have not been identified yet (Delaplace et al. 2015).

Non-chemical signaling communication

Besides the involvement of chemical communication in biotic interactions among microbial populations, other forms of microbial communication were recently discovered thanks to advances in nanotechnologies. This was the case for physical communication, which long went unsuspected in the microbial world. Physical communication is less affected by diffusion constraints than chemical communication and thereby may be propagated through a large number of different media, including the rhizosphere. This communication type can afford faster and greater signal transfer in large-scale spaces than chemical communication. In bacteria, three types of physical signals have been described: (a) electrical signals, (b) electromagnetic and acoustic wave signals, and (c) physical contact.

As far as electrical signals are concerned, particular pili synthesized by *Geobacter sulfurreducens*, called nanowires, allow for extracellular electron transfer (Reguera et al. 2005). In *B. subtilis*, an electrical signal can be propagated under the form of potassium waves over a long distance through a bacterial community biofilm (Prindle et al. 2015). This type of communication system shares some similarity with the nervous system of animals by allowing information to spread to different cells over long distances.

Bacteria can also communicate via acoustic waves (Norris and Hyland 1997). For example, *Bacillus carboniphilus* cells emit acoustic waves between 8 and 43 kHz (Matsuhashi et al. 1998). These acoustic waves are implied in favoring colony

formation under stress conditions (i.e., under non-permissive conditions of KCL concentrations and temperature). Different *E. coli* strains can emit strain-specific acoustic waves (Cox 2014). In an original way, Sarvaiya and Kothari (2015) evaluated the effect of classical Indian music (with frequencies between 38 and 689 Hz) on growth and secondary metabolite and antibiotic production of several bacteria including human pathogens, such as *S. marcescens*, *Staphylococcus aureus*, or *Streptococcus pyogenes*. Positive effects of sound waves were observed on the growth of several strains, and changes in production of pigmented metabolites and greater sensitivity to antibiotics were also recorded. Yet, the precise mechanisms involved in acoustic wave communication are unknown. We can hypothesize that vibrations are sensed by bacterial mechanosensitive ion channels, which in turn trigger adequate responses in the organism exposed to such signals. Thanks to the development of nanotechnologies, new research programs will investigate this unforeseen kind of communication that could play an unsuspected role in microbial cooperation in the rhizosphere.

Tactile communication is another type of physical communication (Dubey and Ben-Yehuda, 2011). *B. subtilis* synthesizes nanotubes that directly connect two cells to each other. These nanotubes render the direct transfer of cytoplasmic compounds between cells possible, as well as of non-conjugative plasmids. They are involved in both intra- and interspecific communication, and may contribute to cooperative interactions in the rhizosphere, with potential positive impacts on plant health and growth.

Various communication systems have been described as involved in the biotic cooperative interactions between micro- and macro-organisms in the rhizosphere and the hyphosphere. It is obvious that progress should be accelerated to apply existing knowledge about microbial communication under controlled conditions to agro-systems and to the design of new strategies and methods for sustainable cropping.

Toward the commercial use of microbial consortia for biostimulation and biocontrol purposes

A few microbial consortia are tested in the field, and some of them are available on the market. The majority of these consortia are mostly based on the addition of microbial plant-beneficial functions. Cooperation has been empirically exploited in some inoculants, but in most cases, without studying the ways microbial components in a consortium cooperate with one another and with the plant. In addition, it must be taken into account that specific responses to consortia might be observed according to plant genotypes and to soil characteristics as those factors are affecting biostimulation and biocontrol effects of rhizospheric cooperative microorganisms

(Vacheron et al. 2013). This is probably due to the complexity of these interactions and the difficulty to investigate them in soil agro-systems.

From greenhouse to field applications of microbial consortia

As early as 1995, Belimov and colleagues inoculated barley with several bacteria. They used three different bacterial genera: *Azospirillum*, *Arthrobacter*, and *Agrobacterium*. *Azospirillum* and *Arthrobacter* strains were used as nitrogen fixers, while the *Agrobacterium* strain was used as a phosphate-solubilizing bacterium (Belimov et al. 1995). These three bacteria were inoculated as dual mixed cultures of *Azospirillum*-*Arthrobacter* or *Azospirillum*-*Agrobacterium*, or as single cultures, on up to three barley varieties, in greenhouse experiments and in the field. Inoculation with a consortium allowed a better nutrient supply to the plants than single inoculations. In particular, plant mineral nitrogen uptake and phosphate uptake increased. Furthermore, in an acidic soil, the ability of *Azospirillum* to establish in the soil was improved by the presence of *Arthrobacter* and *Agrobacterium* through unknown mechanisms. However, improved viability of *Azospirillum*, a well-known plant growth stimulator, could explain the beneficial effects of the bacterial mixtures on the plants. Similar studies were conducted by Wu and collaborators on maize grown in non-sterile soil in greenhouse (Wu et al. 2005). They evaluated the effects of inoculation of mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae* or *Glomus intraradices*) in the presence of different bacteria with specific characteristics: an N-fixer (*Azotobacter chroococcum*), a P-solubilizer (*Bacillus megaterium*), or a K-solubilizer (*Bacillus mucilaginosus*). As in Belimov's study, inoculation of the microbial consortium promoted maize growth, both at high and low fertilization levels. It was partly due to greater bioavailability in nitrogen, phosphorus, and potassium for the maize plants as a result of microorganism inoculation. In addition, the consortium improved the soil chemical characteristics (i.e., organic matter and total nitrogen contents). The authors also showed that the mycorrhizal fungi had a higher capacity to infect maize roots in the presence of bacteria. However, high mycorrhizal infection levels of maize negatively impacted phosphate- and potassium-solubilizing bacteria, for reasons unexplained in that study. Singh and Kapoor used a consortium of two phosphate-solubilizing bacteria (*Bacillus circulans* and *Cladosporium herbarum*) and a mycorrhizal fungus (*Glomus* sp.88) to inoculate wheat in a phosphate- and nitrogen-poor sandy soil in a greenhouse assay (Singh and Kapoor 1999). They compared the plant-beneficial effects of single microorganisms and mixtures of microorganisms. Inoculation with the three microorganisms together best increased grain and straw yields as compared to non-inoculated wheat or single-inoculated wheat. This increase

in growth was correlated with the increase in phosphorus and nitrogen contents in different plant parts (grain, straw, total plant). In addition, the authors studied the culturable bacterial and fungal populations able to solubilize phosphate. While introduction of *B. circulans* positively impacted the phosphate-solubilizing bacterial populations but did not impact fungal populations, inoculation of *C. herbarum* positively impacted fungal populations. *Glomus* inoculation had a rather low impact on both bacterial and fungal phosphate-solubilizing populations. When the three micro-organisms were co-inoculated, both bacterial and fungal populations increased. This correlated to enhanced wheat yields, as well as enhanced phosphorus and nitrogen contents, and established a link between increased nutrient uptake triggered by soil bacterial and fungal plant-beneficial populations on the one hand, and enhanced plant growth on the other hand. Several studies support that bioavailability of essential elements to the plant such as nitrogen, phosphorus, or potassium is improved by crop inoculation with microbial consortia (Zaidi et al. 2004; Rudresh et al. 2005; Kim et al. 2010).

Consortia can also help plants better tolerate abiotic stresses (Nadeem et al. 2013). Wang et al. (2012) studied the effects of inoculation of a consortium on cucumber plants under drought stress. The *Bacillus*-*Serratia* consortium made the plants tolerant to drought by protecting cell integrity, maintaining photosynthetic efficiency, and increasing the activity of certain anti-oxidases to prevent reactive oxygen species (ROS) induced by drought stress from accumulating. Other mechanisms have been described as involved in drought resistance; they are reviewed in Vurukonda et al. (2016).

Consortia are also involved in plant tolerance to salt stress. The effects of four consortia based on halotolerant bacteria belonging to five genera (*Enterobacter*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, and *Achromobacter*) were tested on wheat under two different salt concentrations in a climatic growth chamber. Most of the consortia, and especially those containing endophytic bacteria, increased the emergence, growth, and biomass of wheat plants as well as the activity of superoxide dismutase, which is involved in oxidative stress reduction (Barra et al. 2016). Several plant hormones are produced by PGPR, or their concentrations inside plants are regulated by PGPR, such as auxin (Lambrecht et al. 2000), ethylene (Glick et al. 2007), or gibberellins (Bottini et al. 2004). These molecules are involved in plant growth stimulation (Dodd et al. 2010; Egamberdieva 2013) and tolerance to abiotic stress (Calvo et al. 2014). They might also participate to the positive effects of certain microbial consortia on plants, in addition to improving plant nutrition or alleviating the effects of abiotic stress. However, we still need to increase our knowledge of the mechanisms of action triggered by whole consortia on plants, and how these mechanisms are regulated among consortium partners over time.

Two excellent reviews provide an overview of works carried out on consortia used for biocontrol purposes (Pérez-Montaña et al. 2014; Sama et al. 2015). Most of the studies evaluated the effectiveness of bacterial consortia in protecting host plants against pathogens by quantifying plant growth (biomass and yield) as well as disease symptoms. Most studies report that consortia performed better than individual strains. Both direct antagonistic effects on pathogens and induction of plant systemic resistance (priming effect) have been described. Using a combination of strains with distinct biocontrol traits can ensure that at least one trait will be efficient in the field (Lucas et al. 2009; Sama et al. 2015).

Most of the studies using consortia for biostimulation or biocontrol purposes were carried out under controlled conditions. However, field evaluation was also performed in several cases, and the better performance of consortia versus individuals was confirmed (Srinivasan and Mathivanan 2009; Kumar et al. 2011; Sharma et al. 2012). Unfortunately, the mechanisms leading to the beneficial effects observed with consortia in the field are mostly unknown. However, it is possible to suggest that the observed effects ensue from the mechanisms highlighted under controlled conditions. Nevertheless, a few studies showed negative interactions between consortium members in the field (Larsen et al. 2009), or contrasted results between greenhouse trials and field trials (Smyth et al. 2011). Moreover, the impact of consortium introduction into an agro-system has rarely been studied (Sharma et al. 2012). Their effects on the microbial community, i.e., on microbial structure, diversity, and activity, as well as on the macro-organisms present in the soil, remain to be investigated. Their introduction can be experienced as a soil disturbance and unbalance the ecosystem that may no longer function optimally (Bardgett and van der Putten 2014). With the advent of -omics methods, means are now available to understand in which directions the plant microbiome that plays a pivotal role in plant growth and health is evolving (Van Der Heijden et al. 2008; Berendsen et al. 2012; Berg et al. 2014). The use of consortia can be an innovative way to explore how the plant microbiome works, and decipher how biotic interaction networks in rhizosphere might shift in response to consortium inoculation.

Regulatory viewpoint

From a European regulation viewpoint, the introduction of new products on the market, including microorganisms, thoroughly differs from biostimulation and biocontrol, even more so if applications of microbial consortia are intended. We will not consider the particular case of the USA in the present paper because authorization of new biostimulant products differs among states, as no common law exists at the federal level.

Biostimulation

The biostimulation field currently suffers from non-harmonized regulation in Europe, with different possibilities to access the market depending of the country (i.e., declarative system, authorization with evaluated product, simple notification, and mutual recognition). Biostimulant products are considered as a whole, and their authorization is not always related to their efficiency which is evaluated only in few countries like France or Belgium (Le Mire et al. 2016). The global efficiency criterion is preferred, considering the balance between positive and negative effects, and the economical evaluation of the product.¹ Thus, biostimulant products are characterized by “what they do more than by what they are” (du Jardin 2012). A project of European harmonization is currently on its way; it should be implemented in 2018 in order to increase the level of quality of these products and accelerate their commercial development.

These products and their components must prove a certain innocuousness and non-toxicity toward animals, plants, and the environment, supported by studies or the existing scientific literature. Authorized products are often isolated from the soil and present profiles with low environmental risks. Considering this, the use of microbial consortia for biostimulation purposes appears to be limitless, and several products using associations of microorganisms are already available for sale on the basis of their independent and/or complementary potential.

Biocontrol

Registration of microorganisms for biocontrol purposes follows exactly the same procedure as other conventional pesticides. Each strain of a consortium must be considered as an independent active substance and be subjected to a strict evaluation by the authorities in order to be included in Annex I of the European Commission Regulation 540/2011. Once approval has been granted, companies can propose the products to the countries where they want to market them. Each country will then approve or reject the product according to its own criteria. It is now obvious that in the case of consortia, this form of approval does not take into account the possible interactions between the active substances characterized separately. This question has been addressed for decades (Thompson 1996). However, the diversity of new molecules and products that permanently reach the market clearly limits the possibility of an exhaustive viewpoint of this issue. In the case of microorganisms, the only products authorized for plant protection and containing several organisms contain strains characterized for their individual biocontrol activity. To our knowledge, there is presently no biocontrol product sold

¹ <https://www.eppo.int/>.

worldwide containing a microorganism consortium as an active substance. Would-be pioneers in this field will have to deal with the current regulatory constraints and push for the evolution of their restrictive frame in order to defend a unique property only found within a microbial consortium and not expressed by separate microorganisms.

Conclusion

The massive use of pesticides and fertilizers has had adverse ecological impacts on soils and their productivity (Jacobsen and Hjelmsø 2014). Plant and soil microbial communities appear to have been particularly impacted by the use of chemical inputs that was correlated to a loss of biodiversity in agrosystems (Johnsen et al. 2001; Singh et al. 2015; Nettles et al. 2016). In addition, mono-cropping has also considerably reduced field plant genetic diversity, leading to negative effects on the control of pathogen populations (Kennedy et al. 2002): once pathogens are established, they can invade fields where low genetic diversity of plant resistance prevails as a result of monoculture. In the Yuanyang region of China, the spread of the rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) was studied in rice agrosystems. The association of two rice varieties grown at the same time in the field provided better protection of rice against the disease as a whole (Liao et al. 2016). *M. oryzae* populations were controlled thanks to the different defense mechanisms from each of the rice varieties, allowing for a better control of fungal virulence and spread. Biodiversity losses can cause loss of organisms ensuring specific roles in agrosystems (Jacobsen and Hjelmsø 2014), leading to their dysfunctioning and de facto reduction of their productivity. In response to the 50% reduction of chemical pesticide use by 2025 in France (Ecophyto II plan), more research efforts are needed to produce efficient microorganism- or natural substance-based pest control products. In recent years, biostimulants and biocontrol products have been the focus of main research development. However, up to now, these products have often been composed of only one microorganism. However, as emphasized in this review, microorganisms are rarely alone in natural environments, live in communities, and develop many cooperation strategies with other microbial populations. Considering consortia of microorganisms for the development of new plant protection products therefore appears as a relevant issue. Some pharmaceutical or agri-food industries have already taken into account this capacity of micro-organisms to cooperate and to be more efficient when living in concert (Supaphol et al. 2006; Brenner et al. 2008; Chaucheyras-Durand and Durand 2010; Sabra et al. 2010; Smith 2011; Shong et al. 2012). These consortia can be used to partly restore the soil biodiversity and therefore potentially lost functions within agrosystems. Such restoration may allow weakened

agrosystems to function properly again. Since the discovery of the detrimental effects of intensive agriculture, new, more environment-friendly and ecologically balanced methods of integrated crop production and pest control have been required (Cardinale et al. 2003; Bianchi et al. 2006; Crowder and Jabbour 2014). Exploiting rhizosphere microbial cooperation can participate in overcoming this challenge.

Acknowledgements Yoann Basset-Manzoni was supported by a CIFRE Ph.D grant from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie. Laura Rieusset received a Ph.D fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank A. Buchwalter for English proofreading of this paper. This study was supported by the SymbioMaize ANR project (ANR-12-JSV7-0014-01).

Author contribution Yoann Basset-Manzoni and Laura Rieusset equally contributed to this work as first co-authors. Laura Rieusset designed the figures and tables. All authors participated in writing the manuscript and approved the final version.

References

- Alavi P, Müller H, Cardinale M, Zachow C, Sánchez MB, Martínez JL, Berg G (2013) The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. *PLoS One* 8(7):e67103
- Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V (2015) Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death Dis* 6:e1609
- Audrain B, Farag MA, Ryu CM, Ghigo JM (2015) Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev* 39(2):222–233. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu013>
- Bailly A, Groenhagen U, Schulz S, Geisler M, Eberl L, Weisskopf L (2014) The inter-kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signalling. *Plant J* 80(5):758–771. <https://doi.org/10.1111/tpj.12666>
- Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134(1):307–319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Barbey C, Crépin A, Bergeau D, Ouchiha A, Mijouin L, Taupin L, Orange N, Feuilloley M, Dufour A, Burini JF, Latour X (2013) In planta biocontrol of *Pectobacterium atrosepticum* by *Rhodococcus erythropolis* involves silencing of pathogen communication by the rhodococcal gamma-lactone catabolic pathway. *PLoS One* 8(6):e66642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066642>
- Bardgett RD, van der Putten WH (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515(7528):505–511
- Barra PJ, Inostroza NG, Acuña JJ, Mora ML, Crowley DE, Jorquera MA (2016) Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea americana* Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. *Appl Soil Ecol* 102:80–91
- Barraud N, Storey MV, Moore ZP, Webb JS, Rice SA, Kjelleberg S (2009) Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb Biotechnol* 2(3):370–378. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00098.x>
- Barrios E (2007) Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol Econ* 64(2):269–285. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.03.004>

- Belimov AA, Kojemiakov AP, Chuvarliyeva CV (1995) Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil* 173(1):29–37
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17(8):478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Berg G, Grube M, Schlöter M, Smalla K (2014) Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front Microbiol* 5:148
- Berry C, Fernando WGD, Loewen PC, de Kievit TR (2010) Lipopeptides are essential for *Pseudomonas* sp. DF41 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biol Control* 55(3):211–218. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.09.011>
- Bianchi FJJA, Booi J, Scharntke T (2006) Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Pro R Soc Lond B Biol Sci* 273(1595):1715–1727. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3530>
- Blom D, Fabbri C, Connor EC, Schiestl FP, Klausner DR, Boller T, Weiskopf L (2011) Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ Microbiol* 13(11):3047–3058
- Bottini R, Cassán F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 65(5):497–503
- Brameyer S, Kresovic D, Bode HB, Heemann R (2015) Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci* 112(2):572–577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417685112>
- Brazelton JN, Pfeuffer EE, Sweat TA, Gardener BBM, Coenen C (2008) 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Mol Plant-Microbe Interact* 21(10):1349–1358
- Brenner K, You L, Arnold FH (2008) Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol* 26(9):483–489
- Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E (2000) Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit Rev Microbiol* 26(2):91–110. <https://doi.org/10.1080/1040841009154200>
- Calvo P, Nelson L, Kloepper JW (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383(1–2):3–41
- Cardinale BJ, Harvey CT, Gross K, Ives AR (2003) Biodiversity and biocontrol: emergent impacts of a multi-enemy assemblage on pest suppression and crop yield in an agroecosystem. *Ecol Lett* 6(9):857–865
- Clauheyras-Durand F, Durand H (2010) Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes* 1(1):3–9. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>
- Chin-A-Woeng T, Bloemberg G, van der Bij A, van der Drift K, Schripsema J, Kroon B, Lugtenberg B (1998) Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11(11):1069–1077. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.11.1069>
- Chin-A-Woeng TF, Bloemberg GV, Mulders IH, Dekkers LC, Lugtenberg BJ (2000) Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol Plant-Microbe Interact* 13(12):1340–1345
- Cirou A, Diallo S, Kurt C, Latour X, Faure D (2007) Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ Microbiol* 9(6):1511–1522. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01270.x>
- Combes-Meynet E, Pothier JF, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol Plant-Microbe Interact* 24(2):271–284. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0148>
- Cordovez V, Carrion VJ, Etalo DW, Mumm R, Zhu H, van Wezel GP, Raaijmakers JM (2015) Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Front Microbiol* 6:1–13
- Costa E, Pérez J, Kreft J-U (2006) Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends Microbiol* 14(5):213–219. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.006>
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moëgne-Loccoz Y (2009) *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Let Appl Microbiol* 48(5):505–512. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02566.x>
- Couillerot O, Combes-Meynet E, Pothier JF, Bellvert F, Challita E, Poirier M-A, Rohr R, Comte G, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C (2011) Role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phyto-stimulators. *Microbiol* 157(6):1694–1705. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043943-0>
- Cox TJ (2014). The acoustic emissions produced by *Escherichia coli* during the growth cycle. Theses and Dissertations - Animal and Food Sciences, 33. University of Kentucky. https://uknowledge.uky.edu/animalsci_etds/33
- Crespi BJ (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* 16(4):178–183. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02115-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02115-2)
- Crowder DW, Jabour R (2014) Relationships between biodiversity and biological control in agroecosystems: current status and future challenges. *Biol Control* 75:8–17
- Damore JA, Gore J (2012) Understanding microbial cooperation. *J Theor Biol* 299:31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.03.008>
- De Bruijn I, De Kock MJD, Yang M, De Waard P, Van Beek TA, Raaijmakers JM (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 63(2):417–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05525.x>
- De Bruijn I, De Kock MJD, De Waard P, Van Beek TA, Raaijmakers JM (2008) Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 190(8):2777–2789. <https://doi.org/10.1128/JB.01563-07>
- de Werra P, Huser A, Tabacchi R, Keel C, Maurhofer M (2011) Plant- and microbe-derived compounds affect the expression of genes encoding antifungal compounds in a pseudomonad with biocontrol activity. *Appl Environ Microbiol* 77(8):2807–2812. <https://doi.org/10.1128/AEM.01760-10>
- Debois D, Hamze K, Guérineau V, Le Caër JP, Holland IB, Lopes P, Laprévotte O (2008) *In situ* localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry. *Proteomics* 8(18):3682–3691
- Delaplace P, Delory BM, Baudson C, Mendaluk-Saunier de Cazenave M, Spaepen S, Varin S, Brostaux Y, du Jardin P (2015) Influence of rhizobacterial volatiles on the root system architecture and the production and allocation of biomass in the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *BMC Plant Biol* 15(1):195
- Denison RF (2000) Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by *Rhizobia*. *Am Nat* 156(6):567–576. <https://doi.org/10.1086/316994>
- Dessaux Y, Grandclément C, Faure D (2016) Engineering the rhizosphere. *Trends Plant Sci* 21(3):266–278
- Deveau A, Labbé J (2016) Mycorrhiza helper bacteria. In: Martin F (ed) *Molecular mycorrhizal symbiosis*. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, USA, pp 437–450. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch24>
- Di Palma AA, Pereyra CM, Moreno Ramirez L, Xiqui Vázquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM (2013) Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 338(1):77–85
- Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Am Appl Biol* 157(3):361–379

- Dong YH, Wang LH, JL X, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411(6839):813–817. <https://doi.org/10.1038/35081101>
- Drogue B, Sanguin H, Borland S, Prigent-Combaret C, Wisniewski-Dyé F (2014) Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. *FEMS Microbiol Ecol* 87(2):543–555. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12244>
- Dubey GP, Ben-Yehuda S (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* 144(4):590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- du Jardin P (2012) The science of plant biostimulants - a bibliographic analysis, Ad hoc study report. European Commission, Brussels, p 37
- Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2(5):369–374
- Egamberdieva D (2013) The role of phytohormone producing bacteria in alleviating salt stress in crop plants. In: Miransari M (ed) *Stress and Plant Biotechnology*. Studium Press LLC, Houston, pp 21–39
- Elias S, Banin E (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 36(5):990–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>
- Faure D, Vereecke D, Leveau JHJ (2009) Molecular communication in the rhizosphere. *Plant Soil* 321(1–2):279–303
- Finlay RD, Clemmensen KE (2017) Chapter 23—immobilization of carbon in mycorrhizal mycelial biomass and secretions. In: Johnson NC, Gehring C, Jansa J (eds) *Mycorrhizal mediation of soil: fertility, structure, and carbon storage*. Elsevier, Amsterdam, pp 413–440
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol* 189(22):7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14(9):563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A (2011) Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(4):583–609
- Glick BR, Cheng Z, Czamy J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119(3):329–339. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9162-4>
- Grandclément C, Tannières M, Moréna S, Dessaux Y, Faure D (2016) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* 40(1):86–116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>
- Haas D, Keel C (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 41:117–153
- Haichar FZ, Santaella C, Heulin T, Achouak W (2014) Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* 77:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Hartmann A, Rothballer M (2017) Role of quorum sensing signals of rhizobacteria for plant growth promotion. In: Mehnaz S (ed) *Rhizotrophs: plant growth promotion to bioremediation*. Microorganisms for sustainability, 2nd edn. Springer, Singapore
- Hidalgo-Romano B, Gollihar J, Brown SA, Whiteley M, Valenzuela E, Kaplan HB, McLean RJC (2014) Indole inhibition of *N*-acylated homoserine lactone-mediated quorum signalling is widespread in Gram-negative bacteria. *Microbiol (United Kingdom)* 160:2464–2473
- Hirakawa H, Tomita H (2013) Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Front Microbiol* 4:114
- Hogan DA, Vik Å, Kolter R (2004) A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* 54(5):1212–1223
- Humphries J, Xiong L, Liu J, Prindle A, Yuan F, Arjes HA, Tsimring L, Süel GM (2017) Species-independent attraction to biofilms through electrical signaling. *Cell* 168(1–2):200–209. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.014>
- Jacobsen CS, Hjelmsø MH (2014) Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 27:15–20. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.003>
- Jakobi M, Winkelmann G, Kaiser D, Kempler C, Jung G, Berg G, Bahl H (1996) Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiotics* 49(11):1101–1104
- Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Sørensen J (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—a review. *Biol Fertil Soil* 33(6):443–453. <https://doi.org/10.1007/s003740100351>
- Jousset A, Bonkowski M (2010) The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biol Biochem* 42(9):1647–1649. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.018>
- Jousset A, Rochat L, Scheu S, Bonkowski M, Keel C (2010) Predator-prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*. *App Environ Microbiol* 76(15):5263–5268
- Kaiser C, Kilburn MR, Clode PL, Fuchsluger L, Koranda M, Cliff JB, Solaiman ZM, Murphy DV (2015) Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: mycorrhizal pathway vs direct root exudation. *New Phytol* 205(4):1537–1551. <https://doi.org/10.1111/nph.13138>
- Kennedy TA, Naeem S, Howe KM, Knops JMH, Tilman D, Reich P (2002) Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature* 417(6889):636–638. <https://doi.org/10.1038/nature00776>
- Keohane CE, Steele AD, Wuest WM (2015) The rhizosphere microbiome: a playground for natural product chemists. *Synlett* 26(20):2739–2744
- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF (2003) Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* 425:78–81
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuyse P, Jansa J, Bucking H (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333(6044):880–882. <https://doi.org/10.1126/science.1208473>
- Kim K, Yim W, Trivedi P, Madhaiyan M, Boruah HPD, Islam MR, Lee G, Sa T (2010) Synergistic effects of inoculating arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* strains on growth and nutrient uptake of red pepper (*Capsicum annuum* L.) *Plant Soil* 327(1–2):429–440. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0072-4>
- Kreft JU (2004) Biofilms promote altruism. *Microbiology* 150(8):2751–2760. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26829-0>
- Kuiper I, Legendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GEM, Thomas-Oates JE, Bloembergen GV (2004) Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* 51(1):97–113
- Kumar H, Dubey RC, Maheshwari DK (2011) Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of *Fusarium* wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) *Crop Prot* 30(11):1396–1403
- Lambrecht M, Okon Y, Broek AV, Vanderleyden J (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol* 8(7):298–300
- Lareen A, Burton F, Schäfer P (2016) Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol* 90(6):575–587. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0417-8>
- Larsen J, Comejo P, Barea JM (2009) Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the

- mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. *Soil Biol Biochem* 41(2): 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.029>
- LaSarre B, Federle MJ (2013) Exploiting Quorum Sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(1):73–111
- Le Mire G, Luan Nguyen M, Fassotte B, du Jardin P, Verheggen F, Delaplace P, Haissam Jijakli M (2016) Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 20(S1):299–313
- Lee JH, Lee J (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 34(4):426–444. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x>
- Lee JH, Wood TK, Lee J (2015) Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends Microbiol* 23(11):707–718
- Leimar O, Hammerstein P (2010) Cooperation for direct fitness benefits. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365(1553):2619–2626
- Liao J, Huang H, Meusnier I, Adreit H, Ducasse A, Bonnot F, Pan L, He X, Kroj T, Fournier E, Tharreau D, Gladieux P, Morel J-B (2016) Pathogen effectors and plant immunity determine specialization of the blast fungus to rice subspecies. *elife* 5:e19377
- Lucas JA, Ramos Solano B, Montes F, Ojeda J, Megias M, Gutierrez Mañero FJ (2009) Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Res* 114(3):404–410
- Maddula VSRK, Pierson EA, Pierson LS (2008) Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30-84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *J Bacteriol* 190(8):2759–2766
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(3):1444–1449. <https://doi.org/10.1073/pnas.262672599>
- Matsushashi M, Pankrushina AN, Takeuchi S, Ohshima H, Miyoi H, Endoh K, Murayama K, Watanabe H, Endo S, Tobi M, Mano Y, Hyodo M, Kobayashi T, Kaneko T, Otani S, Yoshimura S, Harata A, Sawada T (1998) Production of sound waves by bacterial cells and the response of bacterial cells to sound. *J Gen Appl Microbiol* 44(1): 49–55. <https://doi.org/10.2323/jgam.44.49>
- Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS (2006) Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol* 44:417–445
- Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER (2012) The black queen hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *MBio* 3(2): e00036–e00012
- Nadeem SM, Naveed M, Zahir ZA, Asghar HN (2013) Plant–microbe interactions for sustainable agriculture: fundamentals and recent advances. In: Arora NK (ed) *Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances*. Springer India, New Delhi, pp 51–103. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_2
- Nadell CD, Drescher K, Foster KR (2016) Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 14(9):589–600
- Nakamura Y, Yamamoto N, Kino Y, Yamamoto N, Kamei S, Mori H, Kurokawa K, Nakashima N (2016) Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(16): 7263–7279. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7532-6>
- Nettles R, Watkins J, Ricks K, Boyer M, Licht M, Atwood LW, Peoples M, Smith RG, Mortensen DA, Koide RT (2016) Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Appl Soil Ecol* 102:61–69. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.008>
- Norris V, Hyland GJ (1997) Do bacteria sing? Sonic intercellular communication between bacteria may reflect electromagnetic intracellular communication involving coherent collective vibrational modes that could integrate enzyme activities and gene expression. *Mol Microbiol* 24(4):879–880. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3951756.x>
- Nowak MA (2006) Five rules for the evolution of cooperation. *Science* 314(5805):1560–1563
- Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16(3):115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ortiz-castro R, Martínez-trujillo M, López-bucio J (2008) *N*-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 31(10):1497–1509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01863.x>
- Pérez-Montaña F, Alias-Villegas C, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169(5–6):325–336
- Phelan VV, Liu W-T, Pogliano K, Dorrestein PC (2012) Microbial metabolic exchange—the chemotype-to-phenotype link. *Nature Chem Biol* 8(1):26–35. <https://doi.org/10.1038/nchembio.739>
- Pierson LS (2000) Expanding the club: engineering plants to talk to bacteria. *Trends Plant Sci* 5(3):89–91
- Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK (2006) Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chem Biol* 2(2):71–78
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181(19):5993–6002
- Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2(4):450–464. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x>
- Prigent-Combaret C, Zghidi-Abouzid O, Effantin G, Lejeune P, Reverchon S, Nasser W (2012) The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *Mol Microbiol* 86(1):172–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08182.x>
- Prindle A, Liu J, Asally M, Ly S, Garcia-Ojalvo J, Süel GM (2015) Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* 527(7576):59–63. <https://doi.org/10.1038/nature15709>
- Raaijmakers JM, Mazzola M (2012) Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 50:403–424
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, de Kock MJD (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol Plant-Microbe Interact* 19(7): 699–710. <https://doi.org/10.1094/MPML-19-0699>
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34(6):1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Ratnieks F, Wenseleers T (2008) Altruism in insect societies and beyond: voluntary or enforced? *Trends Ecol Evol* 23(1):45–52. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.013>
- Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435(7045):1098–1101
- Reyes-Pérez A, María del Carmen Vargas M, Hernández M, Aguirre-von-Wobeser E, Pérez-Rueda E, Encarnación S (2016) Transcriptomic analysis of the process of biofilm formation in *Rhizobium etli* CFN42. *Arch Microbiol* 198(9):847–860. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1241-5>
- Riedinger J, Schrey SD, Tarkka MT, Hampp R, Kapur M, Fiedler HP (2006) Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of

- fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. *Appl Environ Microbiol* 72(5): 3550–3557. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3550-3557.2006>
- Roongsawang N, Hase Ki, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S (2003) Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem Biol* 10(9):869–880
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2016) Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept. *MBio* 7(2):e01395
- Rosier A, Bishnoi U, Lakshmanan V, Sherrier DJ, Bais HP (2016) A perspective on inter-kingdom signaling in plant-beneficial microbe interactions. *Plant Mol Biol* 90(6):537–548. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0433-3>
- Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD (2005) Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Appl Soil Ecol* 28(2):139–146
- Ryu C-M (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134(3):1017–1026
- Ryu C-M, Farag M, Hu C-H, Reddy MS, Wei H-X, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci U S A* 100(8):4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Ryu CM, Choi HK, Lee CH, Murphy JF, Lee JK, Kloepper JW (2013) Modulation of quorum sensing in acyl-homoserine lactone-producing or -degrading tobacco plants leads to alteration of induced systemic resistance elicited by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90–166. *Plant Pathol J* 29(2):182–192. <https://doi.org/10.5423/PPJ.S1.11.2012.0173>
- Sabra W, Dietz D, Tjahjajari D, Zeng A-P (2010) Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. *Eng Life Sci* 10(5):407–421. <https://doi.org/10.1002/else.201000111>
- Santoro AE (2016) The do-it-all nitrifier. *Science* 351(6271):342–343. <https://doi.org/10.1126/science.aad9839>
- Sarma BK, Yadav SK, Singh S, Singh HB (2015) Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biol Biochem* 87:25–33
- Sarvaiya N, Kothari V (2015) Effect of audible sound in form of music on microbial growth and production of certain important metabolites. *Microbiol* 84(2):227–235. <https://doi.org/10.1134/S0026261715020125>
- Schmidt R, Cordovez V, de Boer W, Raaijmakers J, Garbeva P (2015) Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J* 9(11):1–7
- Schnider-Keel U, Seematter A, Maurhofer M, Blumer C, Duffy B, Gigot-Bonnefoy C, Keel C (2000) Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol* 182(5):1215–1225. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1215-1225.2000>
- Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, Van Breusegem F, Eberl L, Hartmann A, Langebartels C (2006) Induction of systemic resistance in tomato by *N*-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* 29(5):909–918
- Sharma S, Gupta R, Dugar G, Srivastava AK (2012) Impact of application of biofertilizers on soil structure and resident microbial community structure and function. In: Maheshwari D (ed) *Bacteria in agrobiology: plant probiotics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 65–77. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27515-9_4
- Shong J, Jimenez Diaz MR, Collins CH (2012) Towards synthetic microbial consortia for bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol* 23(5):798–802. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.02.001>
- Singh S, Kapoor KK (1999) Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol Fertil Soil* 28(2):139–144
- Singh S, Gupta R, Shama S (2015) Effects of chemical and biological pesticides on plant growth parameters and rhizospheric bacterial community structure in *Vigna radiata*. *J Hazard Mater* 291:102–110
- Smith J (2001) The social evolution of bacterial pathogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268(1462):61–69. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1330>
- Smith RP (2011) Design principles and applications of engineered microbial consortia. *Acta Hort* 905:63–69
- Smyth EM, McCarthy J, Nevin R, Khan MR, Dow JM, O’Gara F, Doohan FM (2011) In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 111(3):683–692
- Solanki MK, Singh RK, Srivastava S, Kumar S, Kashyap PL, Srivastava AK (2015) Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus* strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. *J Basic Microb* 55(1):82–90. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300528>
- Srinivasan K, Mathivanan N (2009) Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. *Biol Control* 51(3):395–402. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.013>
- Supaphol S, Panichsakpatana S, Trakulnaleamsai S, Tungkananuruk N, Rongjanajirap P, O’Donnell AG (2006) The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: example using petroleum contaminated tropical soils. *J Microbiol Meth* 65(3):432–441
- Tanouchi Y, Smith R, You L (2012) Engineering microbial systems to explore ecological and evolutionary dynamics. *Curr Opin Biotechnol* 23(5):791–797. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.01.006>
- Thomashow LS (2016) Induced systemic resistance: a delicate balance. *Environ Microbiol Rep* 8(5):560–563. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12474>
- Thomashow LS, Weller DM (1988) Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriol* 170(8):3499–3508
- Thomashow LS, Borsall RF, Weller DM (1997) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Man Environ Microbiol* 509:1–24
- Thompson HM (1996) Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. *Ecotoxicol Lond Engl* 5(2):59–81. <https://doi.org/10.1007/BF00119047>
- Tran H, Ficke A, Asimwe T, Höfte M, Raaijmakers JM (2007) Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol* 175(4):731–742. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02138.x>
- Traxler MF, Kolter R (2015) Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Nat Prod Rep* 32(7):956–970. <https://doi.org/10.1039/C5NP00013K>
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4:356
- Vacheron J, Renoud S, Muller D, Babalola OO, Prigent-Combaret C (2015) Alleviation of abiotic and biotic stresses in plants by *Azospirillum*. In: Cassan FD, Okon Y, Creus C (eds) *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 333–365
- Vacheron J, Moëgne-Loccoz Y, Dubost A, Gonçalves-Martins M, Muller D, Prigent-Combaret C (2016) Fluorescent *Pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Front Plant Sci* 7:1212

- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11(3):296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Venkataraman A, Rosenbaum MA, Wemer JJ, Winans SC, Angenent LT (2014) Metabolite transfer with the fermentation product 2,3-butanediol enhances virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* 8(6):1210–1220. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.232>
- Venturi V, Fuqua C (2013) Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 51(1):17–37. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102239>
- Venturi V, Keel C (2016) Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci* 21(3):187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
- Vurukonda SSK, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A (2016) Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 184(Supplement C):13–24
- Wang C-J, Yang W, Wang C, Gu C, Niu D-D, Liu H-X, Wang Y-P, Guo J-H (2012) Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS One* 7(12):e52565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052565>
- Wang HH, Mee MT, Church GM (2013) Chapter 17 - Applications of engineered synthetic ecosystems. In: Zhao H (ed) *Synthetic biology: tools and applications*. Elsevier, pp 317–325
- Ward BB (2013) Nitrification. In: Scott AE (ed) *Reference module in earth systems and environmental sciences*. Elsevier Amsterdam, The Netherlands. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>
- Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21(1):319–346
- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182(10):2675–2679
- Weidner S, Latz E, Agaras BC, Valverde C, Jousset A (2016) Protozoa stimulate the plant beneficial activity of rhizospheric pseudomonads. *Plant Soil* 410:509–515
- West SA, Cooper GA (2016) Division of labour in microorganisms: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 14(11):716–723
- West SA, Griffin AS, Gardner A, Diggle SP (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 4(8):597–607. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1461>
- West SA, Diggle SP, Buckling A, Gardner A, Griffin AS (2007a) The social lives of microbes. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38(1):53–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740>
- West SA, Griffin AS, Gardner A (2007b) Evolutionary explanations for cooperation. *Curr Biol* 17(16):R661–R672
- Wu SC, Cao ZH, Li ZG, Cheung KC, Wong MH (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125(1):155–166
- Zaidi A, Khan MS, Aamil M (2004) Bioassociative effect of rhizospheric microorganisms on growth, yield, and nutrient uptake of greengram. *J Plant Nutr* 27(4):601–612
- Zhang C, Sheng C, Wang W, Hu H, Peng H, Zhang X (2015) Identification of the lomofungin biosynthesis gene cluster and associated flavin-dependent monooxygenase gene in *Streptomyces lomondensis* S015. *PLoS One* 10(8):1–15
- Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G (2016) Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol* 210(3):1022–1032. <https://doi.org/10.1111/nph.13838>

Ce qu'il faut retenir de la partie

- ♣ L'agriculture a suivi un long processus d'évolution, entrecoupé de révolutions qui ont permis différentes avancées. La dernière révolution en date, ayant introduit l'utilisation d'intrants chimiques et la sélection variétale, a permis un accroissement de la production agricole et une explosion démographique dans le monde en moins d'un siècle.
- ♣ Cette intensification de l'agriculture n'est pas sans conséquence sur l'environnement, et en particulier sur la biodiversité. La fragmentation des paysages ainsi que la toxicité de certains produits chimiques utilisés sont deux des principaux facteurs expliquant la baisse de biodiversité globale.
- ♣ Pour lutter contre les pathogènes de plantes et réduire l'utilisation de pesticides, des méthodes alternatives sont explorées, en particulier la lutte biologique, dont les biopesticides font partie. Ces méthodes sont regroupées sous le terme IPM.
- ♣ Parmi les pathogènes des céréales, en particulier chez le blé, *Fg* représente un acteur majeur, à la fois par son incidence, sa production des mycotoxines et les moyens de lutte à son égard encore relativement limités.
- ♣ Les bactéries représentent un avenir prometteur dans la lutte biologique grâce à leur capacité d'antagonisme et d'induction d'une résistance systémique chez le blé. Une meilleure compréhension des interactions au niveau d'un sol entre les différents protagonistes de la lutte (plante, micro-organismes, macro-organismes) sont la clé pour espérer le succès des biopesticides.

Partie 1

La sélection des souches à fort potentiel de biocontrôle contre
Fusarium graminearum, pathogène du blé

(Publication en cours de soumission à Plos One)

Chapitre 7 - Does selecting the best bacterial Biocontrol agents *in vitro* guarantee success *in planta*? A Wheat-*Fusarium* study case.

Yoann Besset-Manzoni^{ab}, Pierre Joly^b, Aline Brutel^b, Florence Gerin^a, Thierry Langin^c, Claire Prigent Combaret^a

^aUMR Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France

^bBiovitis, Le Bourg, 15 400 Saint Etienne-de-Chomeil, France

^cINRA, UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 5 Chemin de Beaulieu, 63000 Clermont –Ferrand, France

Keywords

Biocontrol bacterial agents, *Fusarium graminearum*, Wheat, antagonism, plant protection

Abstract

Biological control is a great hope for reducing the use of pesticides, which are harmful to the environment and human health. Among the products used in biological control are biopesticides. Biopesticides are microorganisms or molecules produced by microorganisms that will be able to interact with either a plant or the pathogen of this plant to reduce the growth of the pathogen and limit its impact on the growth of the host plant. The genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Trichoderma* are the most common genera found in biopesticide products. When new products are developed, the search for new strains is mostly based on the screening of strains able to inhibit *in vitro* a pathogen of interest *via* antagonistic effects. Strains with no *in vitro* effect are discarded and not tested *in planta*. Is the selection of bacterial agents according to their antagonism effects the best way to get effective biocontrol products? In other words, is promoting the antagonistic potential of strains more effective than selecting strains on the basis of their ability to induce plant protection despite low *in vitro* inhibitory effect? To answer these questions, we used wheat and its pathogen *Fusarium graminearum* as a study model. The results obtained allow us to highlight strains which do not have inhibition phenotypes *in vitro* but good efficacy *in planta*. Thus, developing a biopesticide against *F. graminearum* must be mainly based on the direct screening of strains for their protective activity on wheat plants

against Fusarium Head Blight, rather than on their *in vitro* antagonistic effects on *F. graminearum* growth.

Introduction

Since the Green revolution, the way of crop production has changed. This revolution allowed the mechanization of agriculture but also the first use of chemicals compounds designed by humans to improve health and productivity of plants. By improving the quality and the yield of plant productions, and controlling agricultural pests, chemicals fertilizers and pesticides brought beneficial effects to the society among other social benefits (Aktar et al., 2009; Cooper and Dobson, 2007). All these benefits allowed the worldwide population to expand. But since 1963 and the book 'Silent spring' (Carson, 2002), the negative impacts of pesticides on the human health, wildlife and environment were extensively reported (Köhler and Triebkorn, 2013). These negative impacts can occur at different levels from individual to communities, affecting the whole ecosystem balance. As a main reason of this effect, less than 0,1% of the pesticides used for pest control reach accurately their targets (Pimentel, 1995; Shao and Zhang, 2017), leading the rest of the active substances to the ecosystems. Methods were developed to evaluate the impact of pesticides on the environment, and they allowed to show that pesticide applications must be reduced to limit human health, environmental contamination and reduced soil fertility (Levitan et al., 1995; van der Werf, 1996). Simultaneously, new biological ways of production were developed to control pests in agriculture, among a global strategy called Integrated Pest Management (IPM). One mechanism involved in IPM strategies consists to the use of natural predators, competitors or pathogens of pest targets, known as biological control agents (BCA). These methods are grouped under the biocontrol strategies. The principle of biocontrol is to maintain the pest targeted to a threshold below the limit responsible of negative impacts on the plant. Indeed, some microorganisms from soils have been shown to have beneficial effects on plant growth and health (Avis et al., 2008). The mechanisms involved are quite diverse, ranging from production of antimicrobials to increasing the bioavailability and assimilation of essential nutrients such as nitrogen or phosphorus

(Vacheron et al., 2013). In the hope of finding highly active biocontrol bacteria, the number of studies reporting screening of bacterial libraries against pests have grown exponentially.

In this study we chose to work on the Wheat-*Fusarium graminearum* (*Fg*) pathosystem. *Fg* is a well-known pathogen of cereals and particularly wheat, capable of inducing four types of diseases: damping-off, root-rot, crown-rot, and fusariosis of the ear. The latter is a main threat in wheat production because the pathogen is capable to secrete mycotoxins making grains unsuitable for consumption. Because of its life cycle, the *Fg* chemical control solutions are not very effective (D’mello et al., 1998; Mesterhazy et al., 2003; Milus and Parsons, 1994). In the literature, some bacterial genera, such as *Bacillus* or *Pseudomonas* are often found as bacteria used for biocontrol of *Fg* in the wheat (Dal Bello et al., 2002; Nourozian et al., 2006; Pan et al., 2015; Schisler et al., 2002; Zhao et al., 2014). More rarely, other genera like *Stenotrophomas* (Dal Bello et al., 2002), *Acinetobacter* and *Chryseobacterium* (Khan and Doohan, 2009), *Streptomyces* and *BreviBacillus* (Palazzini et al., 2007) are explored. These bacteria are often derived from either the rhizosphere soil of wheat, or from ears or grains, especially in the case of targeting endophytes (Pan et al., 2015). The isolations, made from soil or plant samples, are carried out on selective (Nourozian et al., 2006) or generalist media (Moussa et al., 2013; Palazzini et al., 2007). The methods of selection of these bacteria are often rely on the ability of the strains to inhibit the growth of the *Fg* fungus *in vitro*. These bacteria are then tested *in planta* in a greenhouse, or directly in the field, on large or small scales (Khan and Doohan, 2009; Schisler et al., 2002). In all the studies, screening steps allow to eliminate bacteria that do not show antagonistic effects on *Fg*, either by the inhibition of growth or the reduction of the mycotoxin concentration. But moving from laboratory to field trials is often leading to bad performances and inconsistent results. Thus, literature confirms that screening is essentially made firstly on *in vitro* inhibition assays against a plant pathogen of interest and that secondly, only the best bacteria are selected for plant protection assays. But, does selecting the best bacteria *in vitro* guarantee success *in planta*? In order to answer this question, we performed in this work a “classical” selection of bacterial strains made from *in vitro* tests against *Fg*, in order to classify the bacteria from our library in different categories of *in vitro*

activities. A wide selection of candidates harboring both high and low *in vitro* activities was then tested in a greenhouse disposal to confirm the first screening step. A particular focus was made to keep some bacterial genera that were not found in the literature, in order to test *in planta* their potential protective activity against *F. graminearum*.

Material and Methods

Constitution of the bacterial strain library

In order to access to a wide diversity of bacterial strains, the library was built from 4 different wheat-growing soils from 4 locations in France, i.e. La Côte Saint André (LCSA, silty loam luvisol, Isère, France) (El Zemrany et al., 2006), the Limagne basin near Clermont-Ferrand (clay-rich soil vertisol, Clermont-Ferrand, France) (Joly et al., 2015), Trellins (45°43'42.1"N 4°01'34.6"E) and Yzeure-sur-Creuse (46°48'39.8"N 0°49'47.2"E). For each sampling site, 5 g of rhizosphere soils were mixed with 10ml of a 0,8% (w/v) NaCl solution. Serial dilutions of soil suspensions were carried out until a dilution of 10^{-9} and 100 μ L of each suspension were spread on 1/10-diluted TSA (Tryptone Soya Agar, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) Petri plates as described by Bachate et al. 2009 (Bachate et al., 2009). After 48h of incubation at 28°C, isolated colonies were transferred on new TSA Petri plates and purified at least two additional times. Pure isolates were then grown in TSB (Tryptone Soya Broth, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 24h at 28°C and then aliquoted and stored at -80°C in glycerol (at 40%).

Strains taxonomic characterization

Isolates from the whole library were taxonomically characterized based on the sequencing of their housekeeping 16SrRNA encoding *rrs* gene. Genomic DNA from all bacteria was extracted using the NucleoSpin Microbial DNA kit (Ref - 740235.50, Macherey-Nagel, Germany). The *rrs* gene was amplified with primers pA/pH (Edwards et al., 1989) and sequenced. The sequences were aligned with Muscle (Edgar, 2004). Phylogenetic tree was inferred using Jalview and the Neighbor-Joining method using PAM250. The tree was represented using iTOL (Letunic and Bork, 2016) .

In vitro screening of the efficacy of bacterial strains to inhibit the growth of *Fusarium graminearum*

The *Fusarium* strain (*Fusarium graminearum* *Fg1*) used throughout experimentations was provided by Dr. Thierry Langin (GDEC Unit, National Institute of Agronomic Research of Clermont-Ferrand, France). This strain isolated from naturally infected cereal grains and maintained in the MycSA collection (INRA, Villenave-d'Ornon, France) is known to be aggressive in terms of disease symptom expression on wheat.

Growth inhibition assay on solid medium

Dual culture protocols were implemented to assess the potential effect of bacterial antagonism on *Fg1* mycelium growth on solid medium. All experiments were carried out in triplicates. First, each bacteria was deposited 2 cm apart from the center of PDA (Potato Dextrose Agar, Conda Pronadisa, Madrid, Spain) plates as a 2 cm-long line, from 24h grown TSB cultures. After incubation at 28°C for 24h, a 6mm-diameter agar with mycelium from the leading edge of a 5 day-old culture of *Fg1* grown on PDA was placed on the center of the plate. For positive control, PDA plates were inoculated only with the pathogen. The plates were then placed at 28°C in the dark for 5 days before the measurement of an inhibition index according to Shi et al. with some modifications (Shi et al., 2014). The efficacy of pathogen growth inhibition was calculated according to 2 measurements carried out on the same plate: the radius of fungal growth towards the site of bacterial growth (bacterial side, BS), and the radius between the center of the plate and the limit of fungal growth towards the site free of bacteria (FS). The inhibition index was build according to the formula: $Index I = BS/FS$.

Then, to compare results from all tested strains, a SEm index (Strain Efficiency against Mycelium) was calculated as follows:

$$Index SEm (\%) = 100 - \left(\frac{Index I strain}{Index I control} \times 100 \right)$$

The SEm Index therefore represents the ability of a strain to inhibit the fungal growth *in vitro* compared to a control without bacteria. The I Index of the positive fungal control (i.e. without bacterial strain) is equal to 1. When SEm is lower than 0 for a given strain, the number is replaced by 0, and the strain is considered as a non-inhibitory strain

Growth inhibition assay on liquid media

Supernatants of bacteria were used to assess their antagonism potential on *Fg1* spore germination and/or mycelium growth in broth, in a microplate assay. All experiments were carried out in triplicates. *Fg1* spores were prepared as described by Florence Cambon (personal communication, see M&M Chapter 10). The supernatant of each bacteria was prepared from a 1-day old TSB culture, centrifugated at 4500 rpm during 10 min and filtered at 0.2µm. For each treatment, 100 µL of supernatant, 100 µL of PDB (Potato Dextrose Broth, Conda Pronadisa) and 50µL of *Fg1* spore suspension at 10⁴ spores/mL were added per microplate wells. As positive controls, 100µL of TSB were used to replace the bacterial supernatants. As negative controls 50µL of PDB were used to replace the *Fg1* spore suspension. After 5 days of culture at 28 °C, microplates were analyzed using an Infinite M200 Pro microplate reader (TECAN, Switzerland). The turbidimetry (that increases with mycelial growth) was measured at 492 nm in each well (Bell et al., 2013).

In order to compare the OD results from the different selected strains, a SEs index (Strain Efficiency against Spore) was calculated as follows:

$$\text{Index } SEs (\%) = 100 - \left(\frac{OD \text{ strain}}{OD \text{ control}} \times 100 \right)$$

In the experiment, the OD of the fungal positive control is equal to 1.7. If the SEs index was lower than 0, the number is replaced by 0 and the strain is considered as a non-inhibitory strain. The higher the SEs index is, the more the strain is able to inhibit *F. graminearum* spore germination and/or mycelium growth from germinated spore.

Wheat protection assay

The plant protection assays against *Fg1* were carried out in a greenhouse (INRA GDEC, Clermont-Ferrand) for a panel of 13 selected strains based on their *in vitro* efficacy against *Fg1* and 2 model biocontrol PGPR strains, *Pseudomonas kilonensis* F113 and *Bacillus amyloliquefaciens* AB42 (provided by the company BIOVITIS). For each condition, 50 seeds of wheat Sumai variety were distributed in 10 pots (12 x 10 x 10 cm) filled with 250 g of compost and 5 plants per pot. For each *in vivo* assay, bacteria were prepared from 24h grown TSB cultures at an optical density at 600 nm (OD_{600nm}) of 1 (*i.e.* 10^8 cells/mL) in sterile water. Bacteria were inoculated on each seed (10^7 cells/seed) with 100 μ L of prepared cultures. After 3 days, *Fg1* spores (10^6 spores/seed) were added. Plants were watered every 3 days in order to keep a moisture close to 40% of WHC. After 45 days of culture, the experiment was stopped and the plants harvested. Different measurements were performed : (i) the chlorophyll rate of each wheat plant consisting of three measures performed on the last formed leaf using a SPAD 502 plus device (Minolta Camera Co., Osaka, Japan); (ii) the size (expressed in cm) of each wheat plant; (iii) the dry weight per pot of aerial parts; (iv) the disease symptoms on each wheat collar using a notation index ranging from 0 (no symptoms) to 3 (high symptoms); (v) the number of ears and the number of flowered ears for each plant; (vi) dry weight of ear of each plant. For disease symptoms, the notation index was recorded as follow: 0 = no necrosis observed, 1= necrosis observed on one sheet, 2= necrosis observed one two sheets and 3= necrosis observed on the whole collar.

In addition, two different controls were also performed: (i) as a positive control, wheat was inoculated with only the pathogen spore suspension, and (ii) as a negative control, uninoculated wheat was used.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R software. PCA analyses were performed to compare plant growth parameters and symptoms between treatments. Comparison of means was made using a Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Results

Composition of the wheat-rhizosphere bacteria library

Two hundred and three cultivable strains were isolated from the 4 soils by dilution-spreading. Two reference biocontrol strains were added: *P. kilonensis* F113 and *B. amyloquefaciens* AB42 known to have antagonistic effects on fungi (Ben Abdeljalil and Vallance, 2016). These 205 strains are distributed among 34 different bacterial genera presented in Figure 1. The most represented genera are *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Chryseobacterium* with respectively 52, 34, 16 and 14 strains per genus. The genera belong to 6 bacterial families, distributed as follows: 32.68% of Gammaproteobacteria, 25.85% of Bacilli, 14.63% of Actinobacteria, 10.24% of Flavobacteria, 9.27% of Betaproteobacteria, 4.39% of Alphaproteobacteria, and 2.93% of Sphingobacteria. The sampling effort was not similar between the soils with, from the highest to the lowest: Clermont 97 strains, LCSA 66 strains, Trellins 27 strains and Yzeures-sur-Creuse 13 strains isolated. Accordingly, a greatest diversity of bacterial genera was obtained from isolates of Clermont soil with 25 different genera, followed by LCSA soil with 14 genera, then Trellins and Yzeures-sur-Creuse soils with 9 genera (Figure S1). The smaller sampling in the two latter soils were mainly used to increase the global diversity of the library, with the addition of new bacterial genera (Figure 1): *Acidovorax*, *Escherichia*, *Lelliottia*, and *SoliBacillus*. Some genera with multiple representatives were present in only one particular soil: *Flavobacterium* (n = 6), *Lysobacter* (n = 6), *Stenotrophomonas* (n = 3), and *Burkholderia* (n = 2) in the Clermont soil, and *Agrobacterium* (n = 2) in the soil of LCSA. Only two genera, *Bacillus* and *Arthrobacter* are found in the 4 soils, and 3 genera are found in 3 soils: *Chryseobacterium*, *Rhizobium* (but with only one representative in each soil) and *Variovorax*.

Fg1 mycelial growth inhibition on solid medium

All isolates (205) were screened for their ability to inhibit the mycelial growth of *F. graminearum Fg1* on Petri dishes. The SEm Index of each bacteria was reported on the phylogenetic tree based on the comparison of the *rrs* gene (Figure 2). The tree was rooted with *the rrs* of the archaeobacteria *Thaumarchaeota archaeon* NAOA2. Arbitrarily, a 50% SEm index threshold was chosen to consider a strain as an inhibitory potential strain. A total of 61 strains obtained a SEm index greater than or equal to 50%.

The distribution of the SEm index is heterogeneous among the bacterial genera, and none of the genus contained only effective inhibitory strains. Seventeen most abundant genera (i.e. genera with more than 3 representatives per genus in the library) were present in the library. While for some genera, such as *Clavibacter*, *Rhizobium* or *Pseudoxanthomas*, the SEm index varied little, for other genera, such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, there was a great heterogeneity regarding their fungal inhibition ability (Figure S2). For example, the genus *Bacillus* shared an average SEm index of about 20% but half of the strains had an SEm index of less than 10%. This means that some strains had a strong *in vitro* inhibitory capacity. However, at the genus level, the overall capacity of the genus was quite limited. In addition, the genus *Bacillus* contained the strain with the highest SEm index (strain 3). Some genus (*Rhizobium*) showed a result of 100% (n = 3) of bacteria with SEm index > 50. The SEm index of *Achromobacter* strains (n = 5) was of 0%. In the most represented genera, *Pseudomonas* (n = 52) and *Staphylococcus* (n = 16), 55% of the strains share a SEm index higher than 50%.

The influence of the soil origin of strains on their ability to have a strong SEm index was then analyzed (Figure S3). When focusing on the genus *Bacillus*, the strains present in the LCSA soil have SEm indexes much higher than the *Bacillus* strains present in the other soils (about 60% in LCSA, and below 20% for the soil of Clermont and below 10% for the soils of Trellins and Yzeures-sur-Creuse). Results for the genus *Chryseobacterium* are opposite: the strains isolated from the Clermont soil are much more efficient, with an average SEm index of about 75% than strains isolated from soils of LCSA (average SEm index of 30%), and Yzeures-sur-Creuse (average SEm index of 45%). For the *Rhizobium* genus, the

strains have an average SEm index of about 60% regardless of their soil origin. Overall, the strains isolated from the LCSA soil seem to be more effective in the inhibition of the fungus than those isolated from the 3 other soils. Indeed, for the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* and *Staphylococcus*, the average SEm index are more important in LCSA soil than in the other soils. The Clermont soil contains strains from 8 different genera with SEm indexes of at least 60% whereas this is only the case for 4 genera in the soil of LCSA, 2 genera in the soil of Trellins, and 1 genus in the soil of Yzeures-sur-Creuse.

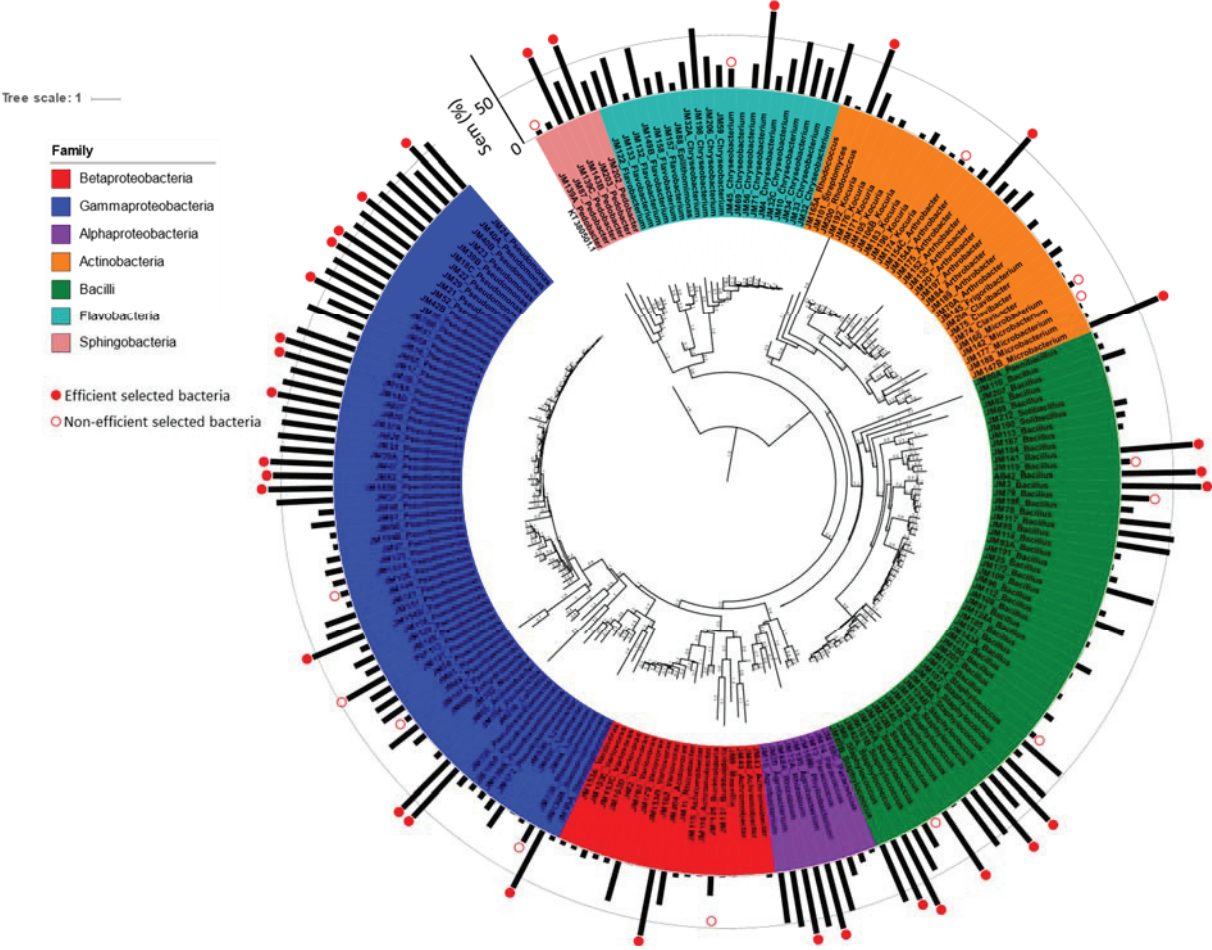


Figure 2 - Mycelium growth inhibition activity (SEm index) for the 205 bacterial isolates of the library according to their *rrs* taxonomical affiliation.

The phylogenetic tree was inferred with Jalview using the Neighbor-Joining method and SEm indexes were associated to the tree using iTOL. Black bars indicate SEm index. The red solid circle indicates efficient bacteria, while empty red circle indicates non-efficient bacteria that were selected for the spore germination inhibition test.

Fg1 spore germination and mycelial growth inhibition in liquid medium

From the different results obtained during solid-state inhibition tests, 33 very effective strains showing a SEM index higher than 50% from 14 different genera were selected (i.e. *Chryseobacterium* (n=1), *Pedobacter* (n=2), *Arthrobacter* (n=1), *Rhodococcus* (n=1), *Microbacterium* (n=1), *Bacillus* (n=3), *Staphylococcus* (n=5), *Rhizobium* (n=2), *Agrobacterium* (n=1), *Stenotrophomonas* (n=1), *Lelliottia* (n=1), *Escherichia* (n=1), *Pseudomonas* (n=12) and *Variovorax* (n=1)). In addition, we also selected 14 little or no-inhibitory strains of 8 common genera (i.e. *Chryseobacterium* (n=1), *Pedobacter* (n=1), *Arthrobacter* (n=1), *Microbacterium* (n=2), *Bacillus* (n=2), *Staphylococcus* (n=2), *Stenotrophomonas* (n=1), and *Pseudomonas* (n=4)) in order to avoid the mis-selection of relevant candidates expressing distinct mechanism of action on *F. graminearum*.

A total of 45 strains from the library and 2 reference strains were selected for this evaluation; they were divided into 14 different genera (Figure 3). As the bacterial mechanisms involved for the inhibition of spore germination may differ from those involved in the inhibition of mycelial growth, our broad strain selection may allow us to select new potential effective strains unrevealed *via* the solid-state inhibition assay. Two genera shared the highest average SEs indexes of about 50%: *Bacillus* and *Staphylococcus*. They included the two most effective spore germination inhibiting bacteria, strains JM3 (*Bacillus* with a SEs of 94%) and JM161A (*Staphylococcus* with a SEs of 91%). However, a great variability level of the SEs index was observed in these two genera, with data ranging from 94% to 8% for *Bacillus*, and from 91% to 25% for *Staphylococcus*. In other genera, except *Arthrobacter* and *Variovorax*, for which average SEs were respectively equal to 14% and 10%, the average SEs was around 25%. Seven strains out of 47 have a SEM higher than 50% (5 *Staphylococcus* and 2 *Bacillus*).

For the 47 strains, the results of their SEM and SEs indexes were combined (Figure 4) and grouped into four distinct classes: class 1 contains strains with SEM and SEs indexes higher than 50%, classes 2 and 3 contain respectively strains with a SEM higher than 50% and a SEs lower than 50% and *vice-versa*, and class 4 SEM and SEs indexes lower than 50%. Fourteen strains belonging to each of this class (1

strain in class 1 among 5, 8 in class 2 among 28, 1 in class 2 among 2 and 4 in class 4 among 12) were then selected for the *in vivo* pot assays based on their *Fg1* inhibition activities and taxonomic affiliation. These 14 strains belong to 7 distinct genera: *Pseudomonas* (n=5; strains JM131, JM154D, JM42B, JM62, F113), *Bacillus* (n=3; strains AB42, JM79, JM3), *Staphylococcus* (n=1; strain JM134), *Microbacterium* (n=1; strain JM147B), *Arthrobacter* (n=2; strains JM152, JM154C), *Agrobacterium* (n=1; strain JM20), and *Variovorax* (n=1; strain JM182).

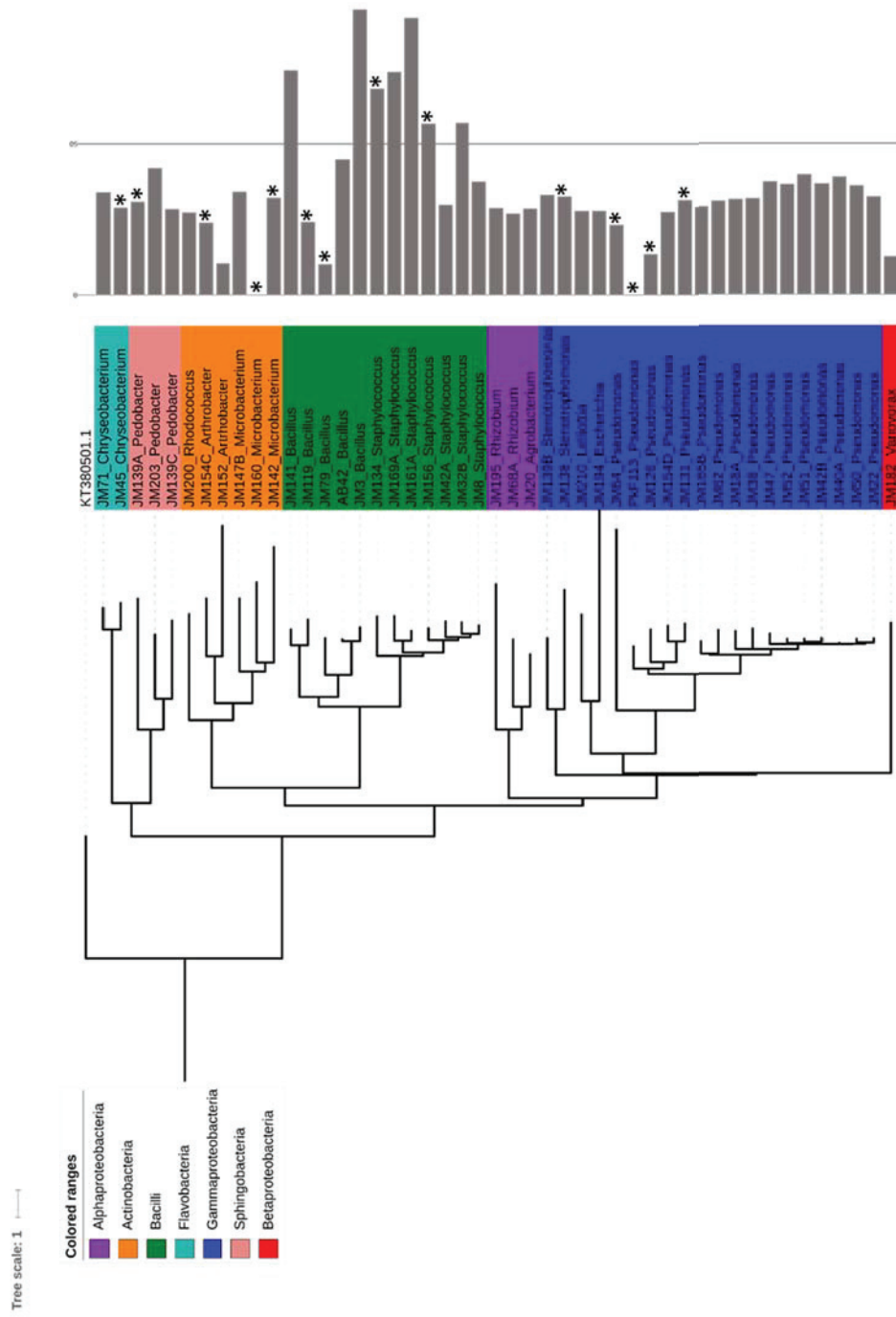


Figure 3 - Spore germination inhibition activity (SEs index) for the 47 strains selected after the first inhibition test, according to their *rrs*-based taxonomical affiliation.

The phylogenetic tree was inferred with the Neighbor-joining method and SEs indexes reported on this tree using iTOL. Grey bars indicate SEs index. Stars indicate bacteria that were not efficient when evaluating their ability to inhibit the *Fg1* mycelium growth in the previous screening assay.

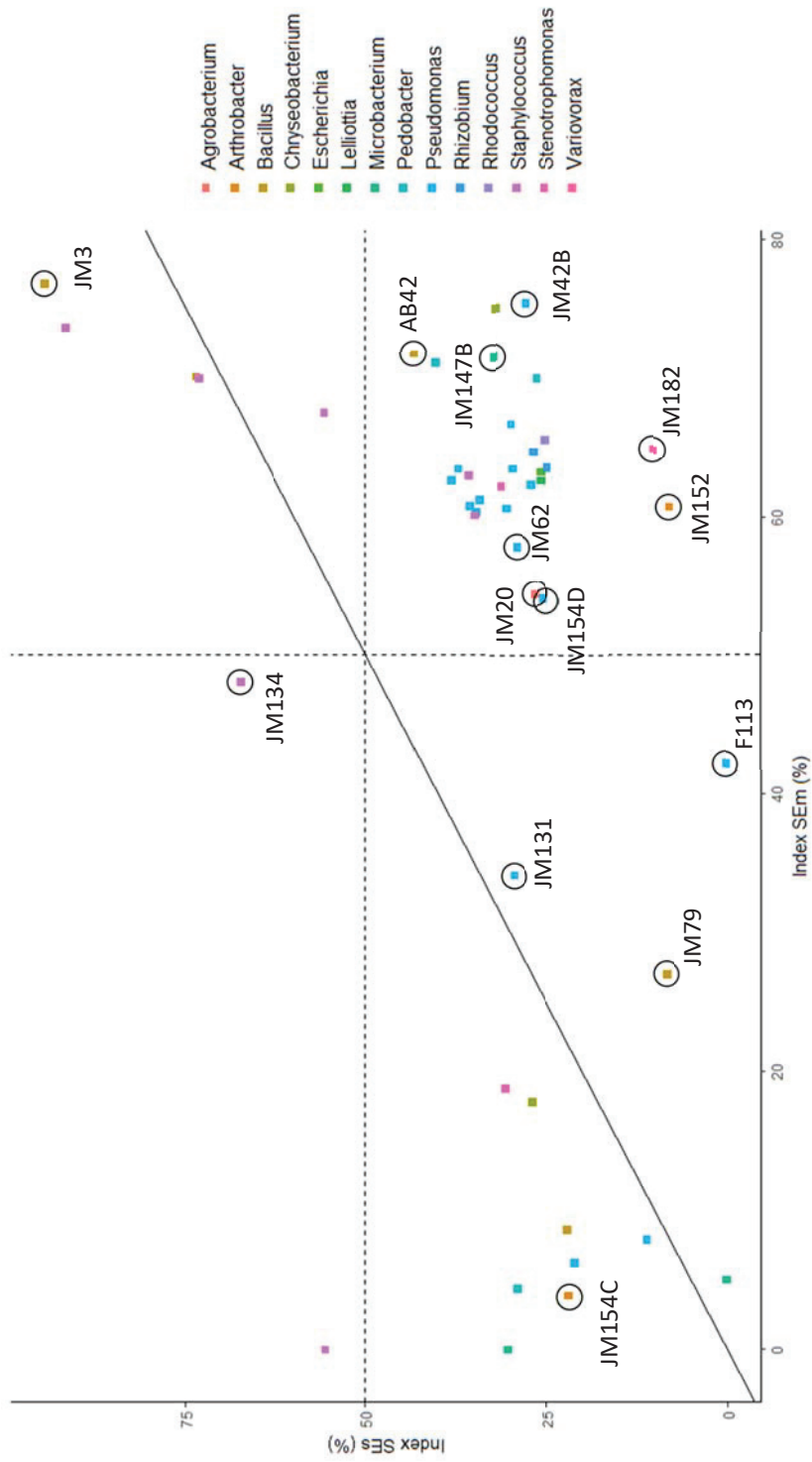


Figure 4 - Selection of strains for *in planta* tests according to their SEM and SEs indexes.

The solid line represents SEs indexes equal to SEM indexes. Bacteria more efficient for inhibiting the spore germination are located above this line, while bacteria more efficient for inhibiting the mycelium growth are located below this line. Dashed lines represent values of SEM and SEs indexes equal to 50%. Bacteria selected for the evaluation of their plant protection activity against *F. graminearum Fg1* are surrounded by dark circle

Wheat protection assay

After 45 days of culture, 6 different plant parameters were recorded on wheat and analyzed together using PCA analysis (Figure 5A and 5B).

Significant differences were observed between the negative (NC) and the positive (PC) control with percentages of the first axis reaching 61.2 % and the second axis, 17.4%. This means that the pathogen inoculation modified different measured plant parameters and significantly affected the physiology of wheat. The distribution of the data is explained by two main groups of factors: plant growth parameters on one hand (*i.e.* size and weight of wheat strands, chlorophyll content, number and weight of wheat ears) and the intensity of disease symptoms (collar rot) on the other hand (Figure 5A). The data were divided into 4 groups (Figure 5B). The first group is composed of strains JM79 and JM3, which are close to the negative control (NC; non-inoculated plants), showing a similar growth as healthy plants (same position on axis 1 on PCA and non-significant difference of means for all growth traits) and reduced disease symptoms (Table 1). The second group is composed of strains JM134, JM154C, JMAB42, JM147B, JM154D, JMF113, JM182, JM42B and JM20. These strains share common data for growth parameters (axis 1) that are lower than the NC but significantly higher than the positive control (PC; inoculated with the pathogen) (Figure 5B, Table 1). For this cluster of strains, weak disease symptoms were observed. A third group was composed of strains JM131 and JM152 (Figure 5B Table 1). These strains exhibited growth parameters as high as those shared by the NC but with disease symptoms as high as the PC. The last group included the strain JM62. Unlike the previous groups, these strains presented reduced growth (*i.e.* similar growth parameters than PC) but weak disease symptoms.

Table 1. Statistical comparison of wheat growth and symptom traits between inoculation treatments.

PCA groups	Strains	Genus	Chlorophyll	Dry weight	Ear number	Ear weight	Strand Size	Symptoms
NC	NC	-	ab [§]	ab	ab	a	a	g
Group 1	JM79	<i>Bacillus</i>	a	ab	abcd	a	ab	ef
	JM3	<i>Bacillus</i>	a	a	ab	ab	a	bcd
Group 2	JM134	<i>Staphylococcus</i>	abcde	abc	ab	abc	bcde	cde
	JM154C	<i>Arthrobacter</i>	abcd	abc	bcde	abcd	abc	ef
	AB42	<i>Bacillus</i>	efg	bcde	abc	ab	cdef	def
	JM147B	<i>Microbacterium</i>	abcde	bcde	abcd	abcd	bcde	fg
	JM154D	<i>Pseudomonas</i>	cdefg	bc	bcde	abcd	abcd	ef
	PkF113	<i>Pseudomonas</i>	gh	abc	cdef	abcd	abcd	def
	JM42B	<i>Pseudomonas</i>	fgh	def	efg	de	def	def
	JM182	<i>Variovorax</i>	bcdef	cdef	defg	bcde	abcd	def
JM20	<i>Agrobacterium</i>	defg	cdef	efg	cde	def	fg	
Group 3	JM131	<i>Pseudomonas</i>	abcde	abc	ab	a	abc	abc
	JM152	<i>Arthrobacter</i>	abc	bcd	a	abc	abc	ab
Group 4	JM62	<i>Pseudomonas</i>	h	f	g	e	f	ef
PC	PC	-	h	ef	fg	e	ef	a

NC: negative control (un-inoculated wheat plants). PC: positive control (wheat plants inoculated with *Fg1* only).

[§] Statistical differences between strains for each tested PBF are indicated with letters a to c. (ANOVA and Tukey's HSD test, $P < 0.05$)

Discussion

F. graminearum is a telluric fungus, particularly present in contaminated plant debris, and attacking cereals. In our study, given our interest for protecting wheat against *F. graminearum*, our library was focused on bacteria growing in the rhizosphere of wheat.

The bacterial genera most commonly found in plant protection studies are the genera *Pseudomonas*, and *Bacillus*. In our study, a more global approach was implemented based on the isolation of culturable bacteria on a generalist agar 1/10-diluted TSA medium, without targeting any distinct genus. Some un-culturable bacteria present in the rhizosphere could of course not be targeted by this protocol, knowing that less than 1% of soil bacteria are known as culturable. Given that un-culturable bacteria can hardly be exploited to develop biocontrol agents, this protocol bias may be acceptable. Another bias in selecting soil bacteria is also linked to the fact that most abundant strains in the starting

sample are more likely to be isolated, as well as the most competitive strains on 1/10-diluted TSA media. Obviously, a small part of the biodiversity present in our starting samples was explored. However, our strain library held 34 different bacterial genera, and the genera found in our study are consistent with previous studies performed on the rhizosphere of wheat (Germida et al., 1998; Yin et al., 2013).

In particular, *Bacillus* and *Pseudomonas* were the two most abundant genera found in the library (Figure 1). This result is consistent with literature data as these genera grow easily and are abundant in rhizosphere soils (Janssen, 2006; Joshi and Bhatt, 2011). More surprisingly, the genus *Staphylococcus* is the 3rd most represented genus. *Staphylococcus* is well documented in the literature, but in the domain of human health, where *Staphylococcus aureus* is known as one species involved in severe nosocomial diseases. Given the fact that *Staphylococcus* strains are well-known as human commensal or pathogens, sparse information regarding the abundance of *Staphylococcus* populations in soil (Joshi and Bhatt, 2011) and their use for agriculture purposes is available. However, several studies have shown that some *Staphylococcus* strains can harbor plant growth promoting properties such as IAA or siderophore production and Zn solubilization (Verma et al., 2016). The beneficial effects of certain *Staphylococcus* in agriculture, particularly on wheat, with significantly improved plant dry and wet biomasses, root length and shoot length were also reported (Sagar et al., 2012). The genus *Staphylococcus* was thus kept in our strain library to study its potential effect against *F. graminearum* Fg1.

The strains were then selected according to their ability to inhibit the mycelial growth of the fungus on agar plate and the germination of *F. graminearum* spore and mycelial growth in liquid medium. Both assays were performed in order to select strains that can inhibit Fg1 along different steps of its life cycle. Indeed the pathogen can be found in soils either as mycelium or spores in plant debris (Goswami and Kistler, 2004).

Agar assays were commonly implemented for identifying bacteria potentially usable as biocontrol agents (Paulitz et al., 1992). Given the timeless and effectiveness of their implementation, dual plate

assays are suitable as a first screening step. Using dual-culture growth inhibition assays on plate with selecting a threshold SEm index higher than 50%, 61 strains of the library, belonging to 14 different genera, were considered as potential interesting biocontrol strains. These 61 strains account for 30% of efficient strains against *Fg* found in the library, a percent in line with different studies (Adhikari et al., 2001; Paulitz et al., 1992; Sadfi et al., 2001; Tjamos et al., 2004), that found between 10 and 50% of efficient bacterial strains against fungal pathogens in library.

We have therefore been able to highlight the diversity of bacterial genera with fungal antagonistic capacity *in vitro*, validating our approach without *a priori*. For spore inhibition microplate assays, we kept 33 interesting strains with SEm index higher than 50%, including the top 30. The originality of our approach was to select, in addition, strains that had not presented promising results on the dual culture plate test. Among the 14 latter strains, the SEm index ranges from 0% to 48%. This choice allowed us to highlight strains which were not effective in the growth inhibition test but which proved to be effective to inhibit spore germination and mycelium growth in liquid medium. Some strains like JM 134 or JM156 show better inhibition activity on spore germination than on mycelium growth on solid medium. These results highlight that different antagonism mechanisms exist in bacteria to achieve the inhibition of mycelium and spore germination. It confirms that less studied antagonist effect targeting spore germination might be a promising way to discover new mechanisms and molecules involved in *Fg* inhibition. Indeed, the original microplate experiment developed in the present work allows to highlight the potential role of secondary metabolites released by strains in culture supernatant in inhibiting germination of fungal pathogen spores. On the selection of 47 bacteria tested in microplate, 7 strains obtained a SEs greater than 50%. These strains belong only to 2 genera: *Bacillus* and *Staphylococcus*. The secondary metabolites of *Bacillus* are well described with several classes of lipopeptides known to inhibit various plant pathogens (Ongena and Jacques, 2008). Due to the lack of studies on the *Staphylococcus* genus for biocontrol purposes, few metabolites are known in the plant-*Staphylococcus* interaction. Some studies have already explore the

phytostimulation effects of the *Staphylococcus* genus (Sagar et al., 2012), but to our knowledge, no study had reported any plant protection potential.

For wheat protection assays, strains were selected to maximize the diversity of the strains at the taxonomic level and the diversity of their mechanisms of actions in the different tests performed *in vitro*, with the inclusion of strains with weak *in vitro* activities.

The *in planta* tests in greenhouse have shown interesting results, confirming that the strains expressing the best activities *in vitro* are not always the strains showing the best results *in vivo* as recently reported by Comby et al. (2017). Indeed, the strain JM79 gave the best results in both plant growth stimulation and plant protection, but very limited antagonistic activity *in vitro*.

While most plant protection studies aim to select bacteria with high fungal antagonistic potential *in vitro*, our study highlights that it is not a *sine qua non* condition for achieving effective plant protection against the fungal pathogen in the rhizosphere. Indeed, other mechanisms than the ability to inhibit the growth of the pathogen can contribute *in planta* to a better resistance of the plant to the disease. First, some bacteria are able to elicit plant induced systemic resistance (ISR) (Conrath et al., 2001; Van Loon et al., 1998). Fluorescent *Pseudomonas* and of *Bacillus* PGPR are well known as able to induce ISR responses by producing secondary metabolites like 2,4-diacetylphloroglucinol or volatile organic compound as a way to protect plant, including wheat (Choudhary et al., 2008; Conrath, 2009; Iavicoli et al., 2003). Through the induction of a still not-well described hormonal regulation network, PGPR bacteria can elicit faster responses of plant defense mechanisms during a pathogen attack (Chagas et al., 2017). This faster defense response will lead to a better resistance of the plant against its aggressor. In addition, some bacteria are known to play roles in geochemical cycles and thus allow the bioavailability of essential elements to plant, such as nitrogen, phosphorus, potassium, but also iron and other rare but essential mineral elements (Khan, 2005). When a plant is not suffering from nutrition limitation, it can express its development program fast, allowing its best resistance to pathogen attack, especially at key steps like seed germination and seedling growth (Mengiste et al. 2003). In addition, PGPR can also play a role in resistance to abiotic stress, such as drought, tolerance

to salt, heavy metal (Dimkpa et al., 2009). Abiotic stresses can make the plant more fragile to pathogen attack because biotic and abiotic stresses simultaneously induce various plant responses that can have negative impacts on the growth (Ramegowda and Senthil-Kumar, 2015). Nevertheless, some studies highlight the positive effect of some abiotic stress in resistance to biotic stress through elicitation of joint metabolic pathways (Achuo et al., 2006; Fraire-Velázquez et al., 2011; Mithöfer et al., 2004). The complexity of soil interactions between prokaryote and eukaryote organisms makes selection of effective strains difficult and tricky. These considerations underline the importance to broaden studied models and scales of studies. Combining bacteria with different modes of actions in inoculant consortia might be an interesting way to circumvent the difficulty of finding strains with good efficacy whatever the tested soils, crops and agrosystems.

In the literature, the immune system of plants is rather well described (Conrath, 2009; Pieterse et al., 2012). In recent years, it has been suggested that the plant microbiome itself contributes to plant health, particularly through the modulation of ISR responses, the direct inhibition of pathogen growth in the rhizosphere such as occurring in disease-suppressive soils (Berendsen et al., 2012).

In our study, the bacterial selection made highlighted how strains can exhibit various ways to achieve plant protection. Interesting antagonist interactions *in vitro* may not always lead to successful protection *in planta*.

The debate around the efficiency of selection method is not new and similar conclusions were given twenty years ago : *in vitro* selection does not guarantee *in planta* success because there are a lot of biotic interactions in soil and with the plant that can lead to biocontrol agent failure (Knudsen et al., 1997; Pliego et al., 2011).

Conclusion

In recent years, various studies demonstrated harmful side effects of conventional pesticides. Whether for environmental pollution or public health problems, it is now accepted that the use of these substances must be reduced. The use of microorganisms as biological control agents represents therefore a credible alternative to support this transition. But their selection represents a big challenge to overcome. By conventional methods targeting cultivable microorganisms, we have demonstrated that the association of different screening protocols allowed to refine the selection of potential biocontrol agents. *In planta* selection seems to be the best way to select biocontrol agents, because it takes into account different mechanisms of plant protection against biotic and abiotic stress occurring in nature. Omics methods can also permit to imagine new way of selecting biocontrol agents by focusing on the community scale and better understanding the interactions and mechanisms put in place between the plant and its microbiota in soil. And, as it is already performed in medicine, it could be considered to inoculate not a single strain, but a consortium of strains, recreating a microbiota that may have been altered over time by the use of fertilizers and pesticides.

Acknowledgments

Yoann-Besset Manzoni work was supported by a CIFRE Ph.D grant from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie. The authors would like to thank Olivier Soudière, Florence Cambon and Aurélie Wauquier for their technical support during greenhouse experiments.

Ce qu'il faut retenir de la partie

- ♣ Cette partie a consisté à sélectionner des bactéries de la rhizosphère du blé en vue de produire un biopesticide permettant de lutter contre *Fg* chez le blé.
- ♣ Notre méthode de sélection est originale, car nous avons choisi de garder des bactéries peu ou pas inhibitrices *in vitro* pour les tester *in planta* car il existe deux manières de protéger une plante : soit par de l'antagonisme soit par l'activation des défenses de la plante.
- ♣ Ce choix a été payant car la bactérie la plus efficace *in planta* est une bactérie présentant peu d'effet d'inhibition *in vitro* (JM79).
- ♣ Les mécanismes ayant conduit à la protection du blé vont faire l'objet d'une exploration plus approfondie afin de connaître la part de l'antagonisme et de l'induction d'une résistance systémique dans la protection.
- ♣ Les différentes bactéries testées et efficaces *in planta* pourraient rentrer dans la composition d'un consortium en vue d'améliorer la protection du blé.

References

- Achuo, E.A., Prinsen, E., Höfte, M., 2006. Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolyopersici*. *Plant Pathol.* 55, 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>
- Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G., Phillips, D.A., Nelson, L.M., 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can. J. Microbiol.* 47, 916–924. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-10-916>
- Aktar, W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Avis, T.J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
- Bachate, S. p., Cavalca, L., Andreoni, V., 2009. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *J. Appl. Microbiol.* 107, 145–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04188.x>
- Bell, S., Alford, R., Garland, S., Padilla, G., Thomas, A., 2013. Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. *Dis. Aquat. Organ.* 103, 77–85. <https://doi.org/10.3354/dao02560>
- Ben Abdeljalil, N.O., Vallance, J., 2016. Bio-suppression of sclerotinia stem rot of tomato and biostimulation of plant growth using tomato-associated rhizobacteria. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 07. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000331>
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Carson, R., 2002. Silent Spring. Houghton Mifflin Harcourt.
- Chagas, F.O., Pessotti, R. de C., Caraballo-Rodríguez, A.M., Pupo, M.T., 2017. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem. Soc. Rev.* <https://doi.org/10.1039/c7cs00343a>
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., Prakash, A., 2008. Volatiles as priming agents that initiate plant growth and defence responses. *Curr. Sci.* 94, 595–604.
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C., Baillieul, F. 2017. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different *in vitro* tests. *Microbiol Res.* 202:11-20. doi: 10.1016/j.micres.2017.04.014.
- Conrath, U., 2009. Chapter 9 Priming of Induced Plant Defense Responses, in: *Advances in Botanical Research*, Advances in Botanical Research. Academic Press, pp. 361–395. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51009-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51009-9)
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., Kohler, A., 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 113–119. <https://doi.org/10.1023/A:1008768516313>

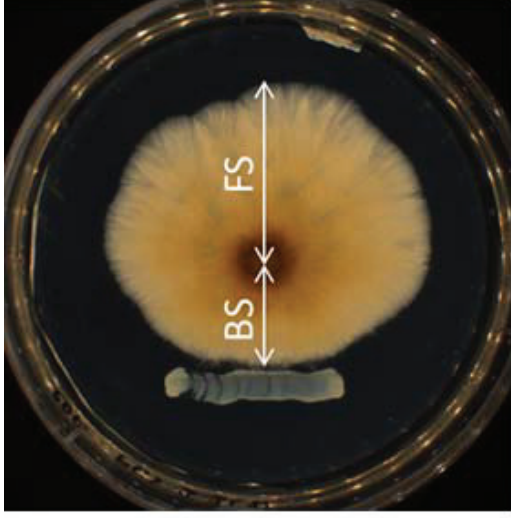
- Cooper, J., Dobson, H., 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot.* 26, 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.022>
- Dal Bello, G.M., Monaco, C.I., Simon, M.R., 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 627–636.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F., 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* 32, 1682–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
- D’mello, J.F., Macdonald, A.M., Postel, D., Dijksma, W.T., Dujardin, A., Placinta, C.M., 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 741–751.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843–7853.
- Fraire-Velázquez, S., Rodríguez-Guerra, R., Sánchez-Calderón, L., 2011. Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants, in: *Abiotic Stress Response in Plants-Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Renato de Freitas, J., Seib, A.M., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00020-8)
- Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5, 515–525. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x>
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux, J.-P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 16, 851–858. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.10.851>
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>
- Joly, P., Bonnemoy, F., Besse-Hoggan, P., Perrière, F., Crouzet, O., Cheviron, N., Mallet, C., 2015. Responses of Limagne “Clay/Organic Matter-Rich” Soil Microbial Communities to Realistic Formulated Herbicide Mixtures, Including S-Metolachlor, Mesotrione, and Nicosulfuron. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 413. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2683-0>
- Joshi, P., Bhatt, A.B., 2011. Diversity and function of plant growth promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalayan region. *Int J Env. Sci* 1, 1135–1143.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.006>
- Khan, M.R., Doohan, F.M., 2009. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. *Biol. Control* 48, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.015>

- Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J., Jensen, D.F., Gerhardson, B., Hökeberg, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L., Henriksen, B., 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 775–784.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Letunic, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Levitan, L., Merwin, I., Kovach, J., 1995. Assessing the relative environmental impacts of agricultural pesticides: the quest for a holistic method. *Agric. Ecosyst. Environ.* 55, 153–168. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(95\)00622-Y](https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)00622-Y)
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R., 2003. The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(11):2551-65.
- Mesterhazy, A., Bartok, T., Lamper, C., 2003. Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of *Fusarium* head blight. *Plant Dis.* 87, 1107–1115. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.9.1107>
- Milus, E.A., Parsons, C.E., 1994. Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* 78, 697–699.
- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W., 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett.* 566, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.011>
- Moussa, T.A.A., Almaghrabi, O.A., Abdel-Moneim, T.S., 2013. Biological control of the wheat root rot caused by *Fusarium graminearum* using some PGPR strains in Saudi Arabia: Biocontrol of wheat root-rot disease. *Ann. Appl. Biol.* 163, 72–81. <https://doi.org/10.1111/aab.12034>
- Nourozian, J., Etebarian, H.R., Khodakaramian, G., others, 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin J Sci Technol* 28, 29–38.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Palazzini, J.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2007. Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Prot.* 26, 1702–1710. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.004>
- Pan, D., Mionetto, A., Tiscornia, S., Bettucci, L., 2015. Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. *Mycotoxin Res.* 31, 137–143. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0224-8>
- Paulitz, T.C., Zhou, T., Rankin, L., 1992. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* hydroponically grown cucumber. *Biol. Control* 2, 226–237. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(92\)90063-J](https://doi.org/10.1016/1049-9644(92)90063-J)
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>

- Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics* 8, 17–29. <https://doi.org/10.1007/BF02286399>
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340, 505–520. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8>
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J. Plant Physiol.* 176, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>
- Sadfi, N., Chérif, M., Fliss, I., Boudabbous, A., Antoun, H., 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *J. Plant Pathol.* 83, 101–117.
- Sagar, S., Dwivedi, A., Yadav, S., Tripathi, M., Kaistha, S.D., 2012. Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* strain Cr11. *Chemosphere* 86, 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.031>
- Schisler, D.A., Khan, N.I., Boehm, M.J., Slininger, P.J., 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. *Plant Dis.* 86, 1350–1356.
- Shao, H., Zhang, Y., 2017. Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Sci. Rep.* 7, 5521. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>
- Shi, C., Yan, P., Li, J., Wu, H., Li, Q., Guan, S., 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 1094–1105. <https://doi.org/10.3390/ijerph110101094>
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Katinakis, P., 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 35–44. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000010132.91241.cb>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(96\)01096-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(96)01096-1)
- Van Loon, L.C., Bakker, P., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483.
- Verma, P., Yadav, A.N., Khannam, K.S., Kumar, S., Saxena, A.K., Suman, A., 2016. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *J. Basic Microbiol.* 56, 44–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500459>
- Yin, C., Hulbert, S.H., Schroeder, K.L., Mavrodi, O., Mavrodi, D., Dhingra, A., Schillinger, W.F., Paulitz, T.C., 2013. Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7428–7438. <https://doi.org/10.1128/AEM.01610-13>

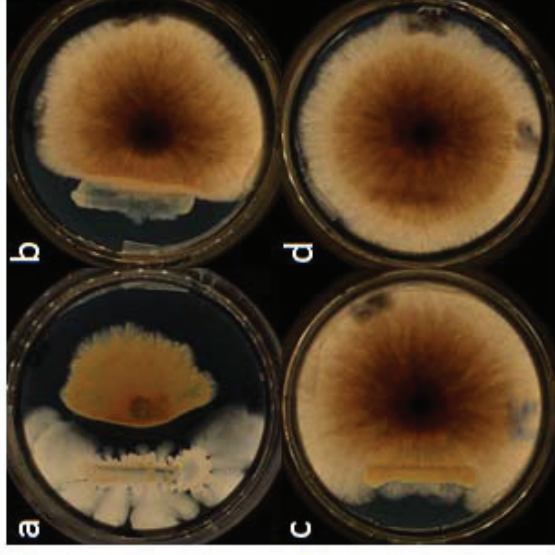
Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y.M.E., Liu, Y., 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLOS ONE 9, e92486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>

Supplementary data



$$Index\ I = \frac{BS}{FS}$$

$$Index\ SEM\ (\%) = 100 - \left(\frac{Index\ I\ strain}{Index\ I\ control} \times 100 \right)$$



a : Index I < 0,25 ; b: 0,25 < Index I < 0,5 ; c: 0,5 < Index I < 0,75 ; d : Index I > 0,75

Figure S 1 – Description of index SEM.

Left: description of the SEM index used to define the efficacy of a strain. For each strain, including positive control, an index I is calculated and serves as the basis for calculating the SEM index. Right: photographs representing 4 different levels of I indexes, showing the extent of the visible results.

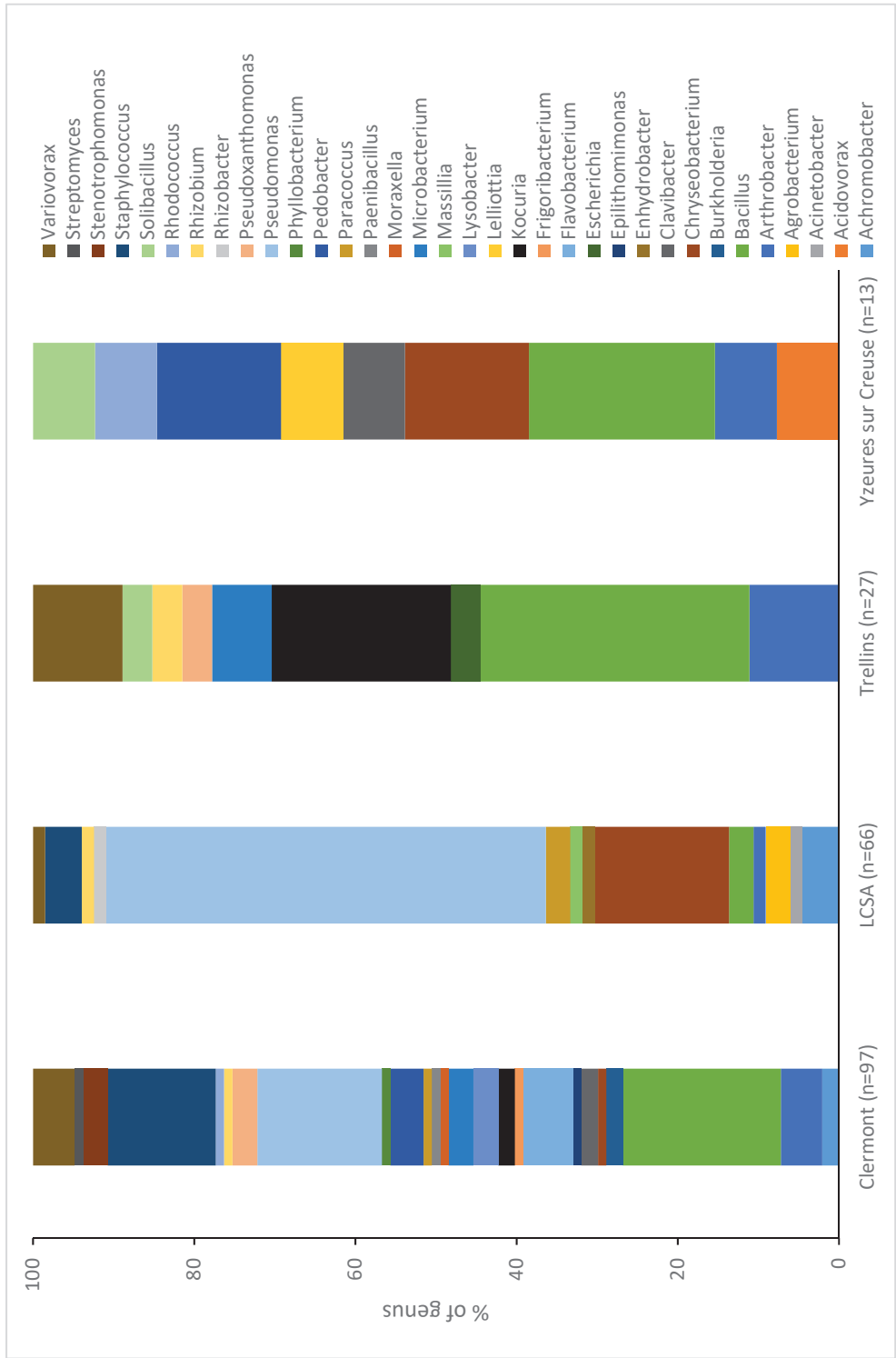


Figure S 2 - Distribution of strains according to their soil of origin.

In parenthesis, the number of strains isolated from the soil, representing the sampling effort. Results are expressed as a percentage of the number of strains isolated from the soil.

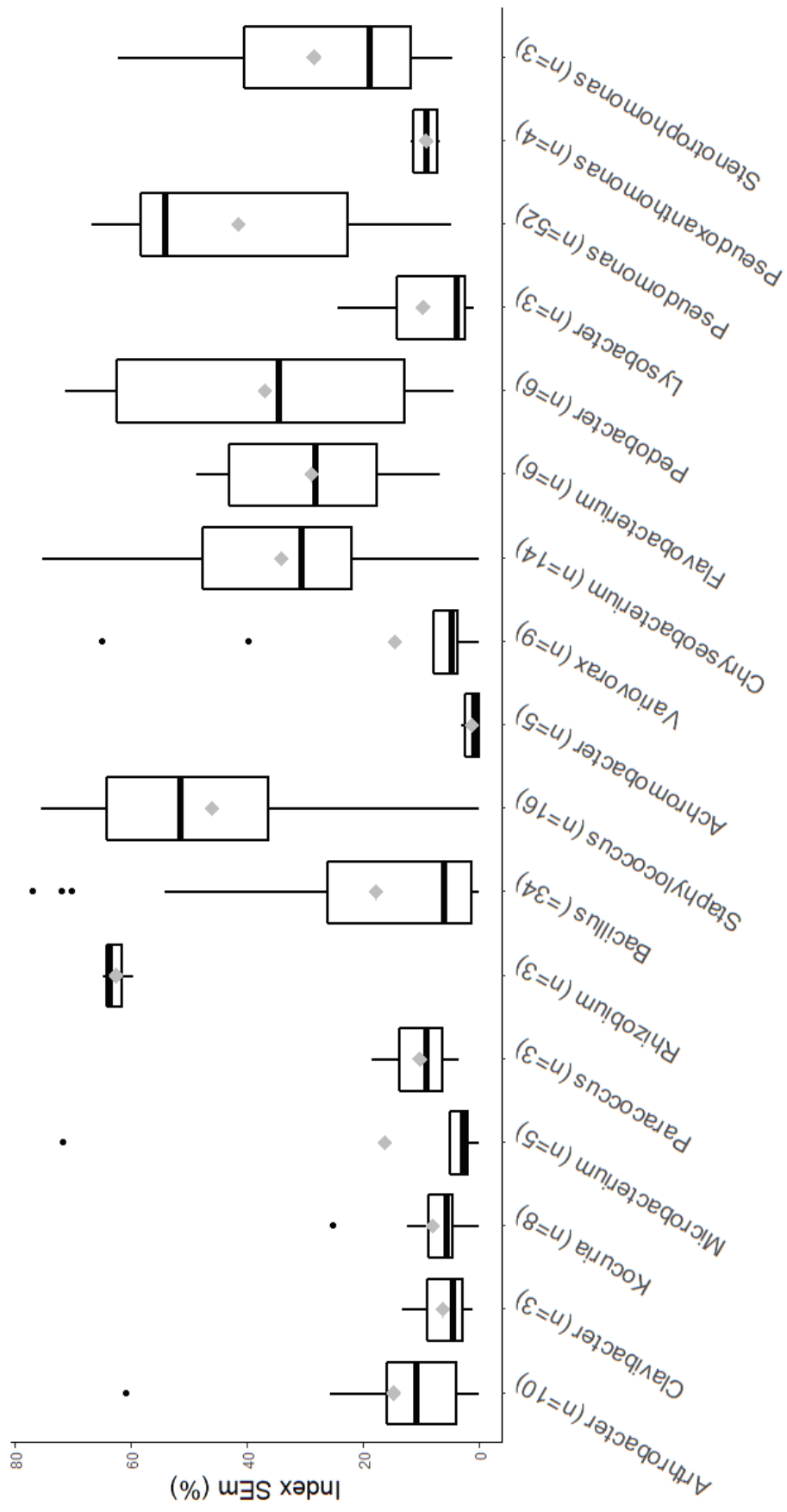


Figure S3 - Inhibition index SEm (%) depending of the bacterial genera

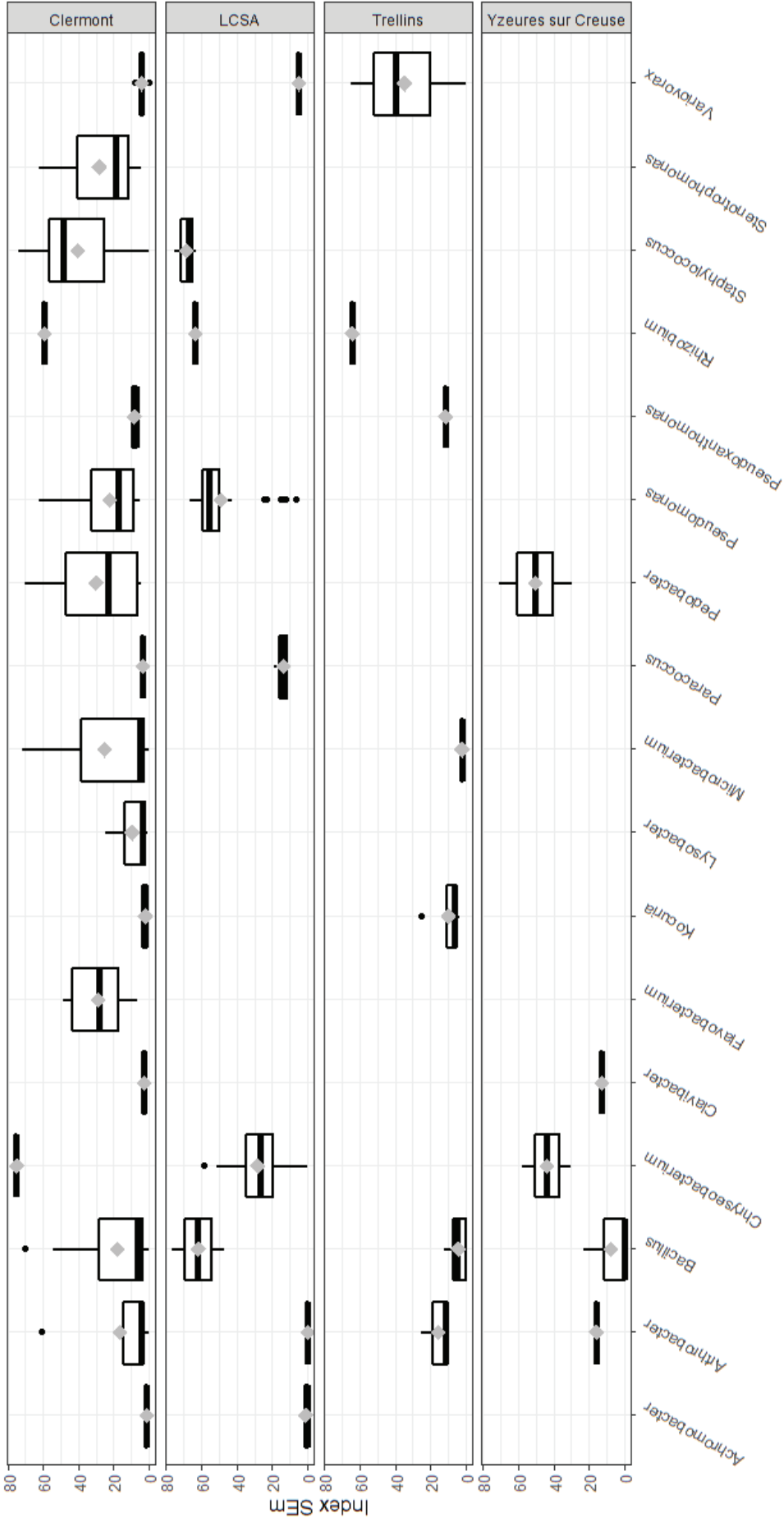


Figure S 4 - Inhibition index SEM (%) according to bacterial genera and soil origin

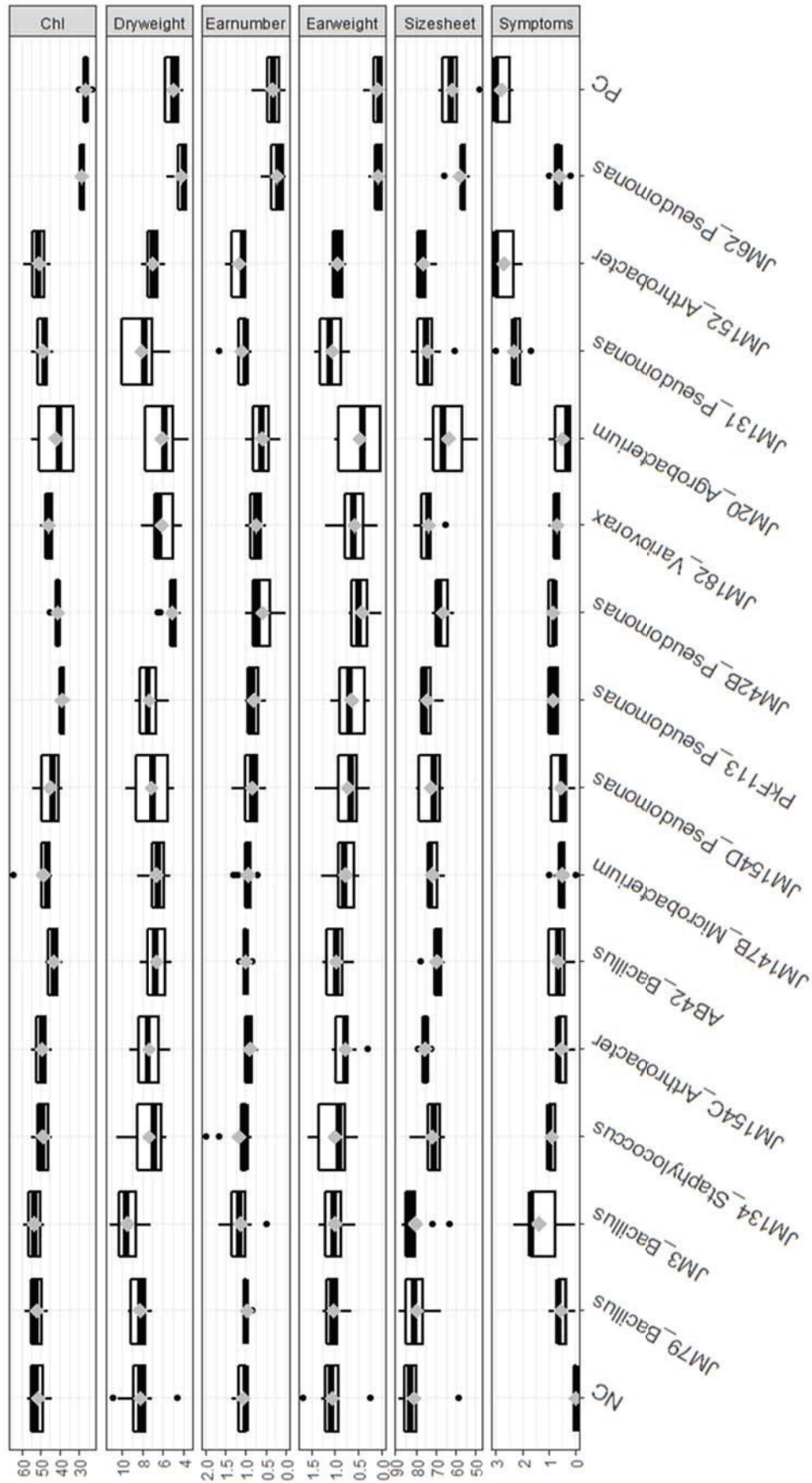


Figure 5 - Global results of the different parameters recorded during *in planta* experiments for the different strains tested.

NC = Negative control and PC = Positive control. The units of the measured parameters are : arbitrary unit for chlorophyll, g for dry weight of aerial part, number for ear number by plant, g for dry weight of ear, cm for the length of sheet and arbitrary unit for symptoms (according to the scale describing in the Material and Method section).

Partie 2

Du consortium à la caractérisation de métabolites impliqués
dans l'antagonisme contre *Fusarium graminearum*

La première partie de cette thèse s'est donc attelée à sélectionner des bactéries pouvant être utilisées comme potentiels agents de biocontrôle. Nous avons pu remarquer, dans notre étude précédente (Partie 1), que les bactéries ayant de forts effets inhibiteurs *in vitro* n'étaient pas obligatoirement les plus efficaces *in planta*. Dans cette partie, nous avons voulu explorer les capacités de coopération entre bactéries. Comme vu dans la revue (*cf* Chapitre 6), ces coopérations au sein de la rhizosphère sont multiples et les différentes bactéries engagées dans ces coopérations peuvent accomplir des fonctions différentes menant au bon fonctionnement de l'écosystème. Partant de ce constat, nous avons choisi d'explorer, dans cette partie, la capacité d'une communauté synthétique à inhiber *Fg*, en utilisant les bactéries sélectionnées dans la Partie 1.

Nous avons donc dans un premier temps réalisé des tests *in vitro* à partir de combinaisons de 8 bactéries avec toutes les combinaisons possibles (c'est-à-dire via une approche combinatoire) afin de déterminer si des associations particulières permettaient une synergie ou au contraire si l'interaction entre certaines bactéries pouvait altérer les capacités d'inhibition de la germination des spores de *Fg*. Dans un deuxième temps, nous avons choisi de faire un *focus* sur deux bactéries proches phylogénétiquement mais n'ayant pas les mêmes activités biologiques par des approches de génomique comparative et de métabolomique.

Chapitre 8 – Exploration du potentiel inhibiteur des consortiums

Introduction

Dans l'agriculture, l'utilisation de consortium n'est pas nouvelle. Historiquement, l'association de micro-organismes a été étudiée pour la dépollution des sols. En effet, de nombreuses études se sont intéressées à la dégradation des pesticides et des engrais dans les sols. Par exemple, une équipe de recherche aux Etats Unis, menée par de Souza, a mis en évidence la dégradation de l'atrazine dans les sols grâce à un consortium composés de 4 bactéries ou plus, dont principalement *Pseudomonas* sp. CN1 et de *Clavibacter michiganese* ATZ1 (Souza et al., 1998). Ces deux bactéries sont capables de dégrader l'atrazine grâce à l'utilisation par *Pseudomonas* des produits de dégradation obtenus par *Clavibacter*. La dégradation de l'atrazine leur permet de l'utiliser comme source de carbone et d'azote. Ils ont pu montrer que la dégradation était plus importante en présence des deux bactéries qu'avec la seule présence de *Clavibacter*. De plus, le consortium est capable de dégrader un plus grand nombre d'atrazines différentes qu'attendu. Des études similaires ont été faites sur d'autres composés comme le diazinon (Cycoń et al., 2009), le methyl parathion et le chloryrifos (Pino and Peñuela, 2011), ou le p-nitrophénol, composé de base de nombreux fongicides (Qureshi and Purohit, 2002). Les consortiums bactériens ont aussi été impliqués dans la dépollution de sols contaminés à des métaux lourds (Khan, 2005; Kozdrój and van Elsas, 2000; Valls and de Lorenzo, 2002). Mais les consortiums bactériens, au-delà de la dépollution peuvent être utilisés pour la production d'énergie à partir des déchets liés à l'agriculture ou la transformation de produits issus de l'agriculture. Par exemple, dans la production de biofuels, où à partir de déchets issus de l'industrie de la pomme de terre, et en combinaison avec des microalgues, des consortiums sont capables de produire du méthane (Hernández et al., 2013). Exemple plus étonnant, l'utilisation de consortiums pour traiter les déchets issus de l'industrie de la bière afin de créer du biohydrogène, une source d'énergie qui pourrait à terme aider à remplacer les énergies fossiles.

Les consortiums bactériens peuvent aussi être utilisés directement au champ en tant qu'accélérateur de la dégradation des résidus de culture, comme par exemple avec les résidus de canne à sucre (Beary et al., 2002). Toutefois, peu d'études s'intéressent à la dégradation *in situ* des résidus de cultures, les études étant davantage portées sur l'utilisation de ces résidus pour la production de bioénergie ou pour leur recyclage (Singh et al., 2012).

Depuis quelques années, la recherche explore le potentiel de ces consortiums à être utilisé comme de potentiel agent de lutte biologique. Alors qu'au départ, les recherches se sont beaucoup développées autour de l'utilisation d'une bactérie comme moyen de lutte, avec les avancées des moyens techniques et des compréhensions sur les interactions, l'utilisation des consortiums, semble, sur le papier, présenter de nombreux avantages. En effet, l'utilisation de consortiums pourrait : i) augmenter le potentiel de chaque acteur, par des effets de synergies, pour renforcer l'action souhaitée, ii) permettre une double action de protection des cultures, grâce à des bactéries agissant soit par antagonisme, soit par induction d'une résistance systémique, iii) permettre un plus grand nombre de mécanismes de contrôle de s'exprimer en même temps, avec pour objectif de réduire l'apparition de résistance, iv) permettre à un plus grand nombre de fonctions de s'exprimer, et par conséquent d'avoir une approche de traitement moins ciblée sur un pathogène mais sur plusieurs, mais aussi plus uniquement sur de la phytostimulation ou de la phytoprotection, mais sur les deux simultanément, et v) d'augmenter les probabilités d'installation d'une bactérie issue d'un consortium, car la grande diversité des sols est un frein au succès de l'installation d'une bactérie de façon universelle dans chacun de ces sols. A l'heure actuelle, comme décrit dans la revue (cf. chapitre 6), les résultats obtenus à partir de l'utilisation de consortiums restent mitigés, en particulier chez les céréales (Besset-Manzoni et al., 2018).

L'approche basée sur les consortiums peut permettre de créer des communautés artificielles, se rapprochant d'un microbiote naturel, et ainsi de mieux comprendre les interactions entre les différents partenaires, en augmentant la complexité du système au fur et à mesure. Une meilleure compréhension des interactions devrait, à terme, permettre d'optimiser l'utilisation de consortiums au champ, dans l'espoir d'obtenir des résultats concluants. Le but de cette étude a été triple : i) trouver, à partir de l'association de 8 bactéries, la combinaison la plus efficace pour inhiber la germination des spores de *Fg*, ii) déterminer si l'ajout de bactéries ayant des fonctions différentes n'altère pas l'efficacité de la protection *in vivo*, et iii) déterminer si, dans les associations présentant des résultats intéressants, l'association permet une synergie entre les acteurs ou si les résultats de l'association obtenus ne sont que l'addition de l'effet de chaque acteur. Nous avons pour cela sélectionné les bactéries présentant les résultats les plus intéressants lors de l'expérience menée à Clermont-Ferrand sur les tests *in planta*.

Matériel et Méthodes

Souches bactériennes utilisées

A partir des tests *in planta*, 8 bactéries ont été sélectionnées : *Bacillus* JM79, *Staphylococcus* JM134, *Bacillus amyloquefaciens* AB42, *Pseudomonas* JM131, *Bacillus amyloquefaciens* JM3, *Microbacterium* JM147B, *Pseudomonas* JM154D, et *Pseudomonas kilonensis* F113, souche modèle du laboratoire. Elles sont conservées dans du glycérol à - 80°C.

Préparation des combinaisons

A partir des 8 bactéries, toutes les combinaisons possibles, c'est-à-dire seules ou en mélange de 2 à 8, ont été réalisées (255 combinaisons au total). Chaque souche a été cultivée dans du TSB (Trypton Soy Broth) à 28°C dans 100mL de culture à 180 rpm (rotation par minute). Après 24-48h de culture, les cultures ont été ajustées à une densité optique (DO) à 600nm de 1 dans un volume de 70mL. Pour chaque combinaison, 500µL de culture de chaque bactérie présente dans la combinaison ont été ajoutés à 4,5mL de TSB. Les cultures ont été incubées 48h à 28°C sous agitation (180rpm).

Préparation des surnageants

Après 48h de culture, 1,8mL de chaque culture ont été prélevés et transférés dans un tube Eppendorf de 2mL pour une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm. Le surnageant a été prélevé à l'aide d'une seringue et filtré à l'aide d'un filtre 0,2µm. Le surnageant a été utilisé directement pour les tests réalisés en microplaque, d'inhibition de la germination des spores de *Fg*. Une mesure de DO à 600nm est effectuée pour chaque combinaison avant prélèvement du surnageant.

Test sur la capacité des combinaisons à inhiber la germination des spores

Pour chaque combinaison, 100 µL du surnageant ont été déposés dans un puits d'une plaque 96 puits. Dans chacun de ces puits ont été rajoutés 100 µL de milieu PDB nécessaire à la germination des spores de *Fg*, ainsi que 50µL d'une suspension de spores à 10⁴ spores/mL de *Fusarium graminearum*. Des témoins négatifs en absence de champignon (avec 150µL de milieu PDB et 100µL de TSB) et des témoins positifs contenant seulement le champignon (avec 100µL de PDB et de TSB et 50µL de la suspension de spores) ont été réalisés. La microplaque a ensuite été incubée à 28°C pendant 4 jours à l'obscurité puis la prise de la DO à 492nm a été effectuée à l'aide d'un spectrofluorimètre Infinite 200 (TECAN, Suisse). Pour chaque combinaison, 3 réplicats ont été effectués. L'expérience a été répétée 3 fois dans le temps.

Résultats

Effet sur la croissance des différentes combinaisons

Les 255 combinaisons sont réparties comme tel: 8 combinaisons comprenant une bactérie, 28 combinaisons avec 2 bactéries, 56 combinaisons avec 3 bactéries, 76 combinaisons avec 4 bactéries, 56 combinaisons avec 5 bactéries, 28 combinaisons avec 6 bactéries, 8 combinaisons avec 7 bactéries et 1 combinaison avec 8 bactéries. Chaque bactérie est présente dans 128 combinaisons différentes. D'un point de vue de la croissance, dans chaque combinaison, le nombre de bactéries ne semble pas impacter la croissance globale des communautés artificielles (Figure 1a). Par contre, cette croissance est légèrement affectée quand les souches AB42 et JM3 se retrouvent dans les combinaisons (Figure 1b).

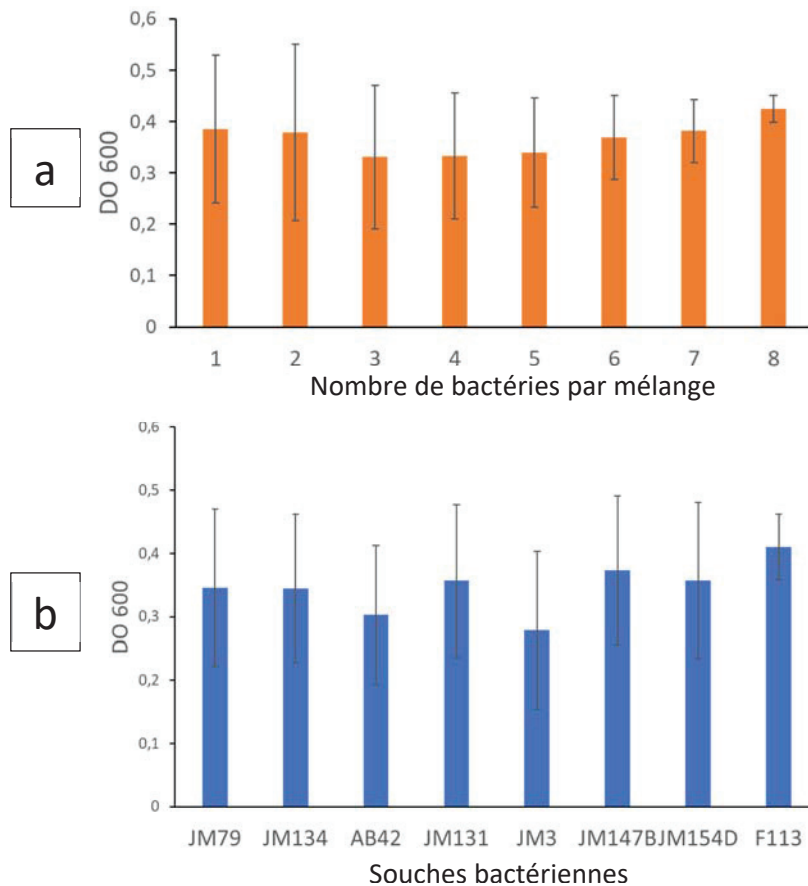


Figure 1 - Croissance bactérienne moyenne, estimée par mesure de la densité optique à 600nm, des cultures des différentes combinaisons.

En a, les données représentent la moyenne des valeurs obtenues dans les cultures en fonction du nombre de bactéries dans les combinaisons, et en b, en fonction des souches testées. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.

Effet sur l'inhibition de la germination des spores de *Fg* et la croissance

Sur l'ensemble des combinaisons, les combinaisons de 3 et de 4 bactéries semblent présenter les meilleurs résultats d'inhibition (données non montrées). En ce qui concerne les différences entre souches bactériennes, la présence de JM3 et dans une moindre mesure de AB42, permettent d'obtenir les meilleures activités d'inhibition, avec respectivement des DO_{495nm} moyenne atteignant 0,738 et 1,021 comparativement à 2,028 pour le témoin *Fg* en absence de bactéries. Néanmoins, la variabilité entre souches dans les combinaisons est importante. Afin d'explorer les capacités de chacune des souches à inhiber la germination des spores dans les combinaisons testées, 8 classes d'inhibitions ont été créées : classe I ($DO_{495nm} < 0,250$), classe II ($0,250 < DO_{495nm} < 0,500$), classe III ($0,500 < DO_{495nm} < 0,750$), classe IV ($0,750 < DO_{495nm} < 1$), classe V ($1 < DO_{495nm} < 1,250$), classe VI ($1,250 < DO_{495nm} < 1,500$), classe VII ($1,500 < DO_{495nm} < 1,750$) et la classe VIII ($DO_{495nm} > 1,750$). Dans chaque classe, pour chaque bactérie, est calculé le nombre de fois (occurrence en %) auquel elle est retrouvée (Figure 2). Ceci permet de voir la répartition de chaque bactérie au sein des différentes classes. Plus une bactérie est retrouvée dans les 4 premières classes, plus son effet d'inhibition est fort. Cette analyse montre que 80% des combinaisons contenant JM3 se retrouvent dans ces 4 premières classes, contre seulement 30% de combinaisons pour F113. Pour les souches AB42, JM134, JM79, JM131, JM154D et JM147B, ce pourcentage est respectivement d'environ 60%, 50%, 49%, 46%, 45%, et 44%. Sur l'ensemble des résultats analysés, les souches JM3 et AB42 semblent plus souvent retrouvées dans les combinaisons

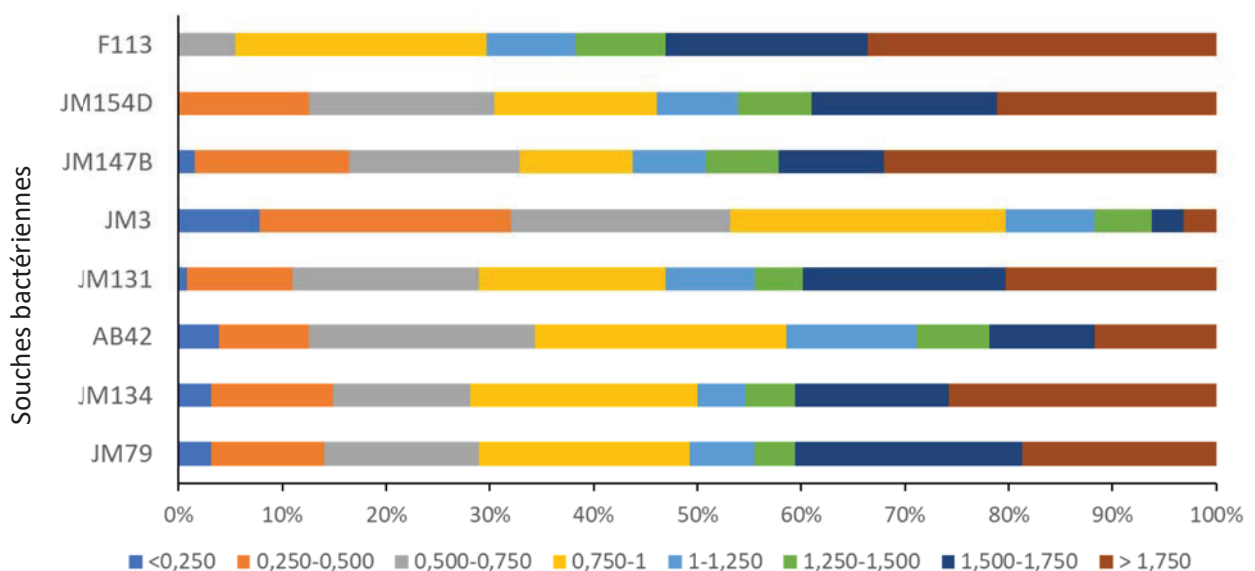


Figure 2 – Répartition, en termes d'activité d'inhibition de la germination de *Fg*, des différentes combinaisons testées selon les souches étudiées.

La répartition (% calculé pour chaque souche en fonction du nombre de combinaisons dans la classe par rapport au nombre total de combinaisons par souche) est exprimée en fonction de la DO_{492nm} obtenue lors des tests en microplaque. Huit classes de DO ont été définies (de <0,250 à >1,750 avec 0,250 entre chaque intervalle).

efficaces, alors que F113 semble être la souche la moins efficace.

Une analyse similaire a été effectuée sur le nombre de bactéries par combinaisons (Figure 3). Toutefois, le nombre de combinaisons n'est pas le même pour chaque groupe, contrairement à l'analyse sur les souches. L'interprétation des résultats reste donc délicate. Dans les combinaisons par 4 ou 5 bactéries, environ 60% présentent une DO inférieure à 1 (classes I à IV).

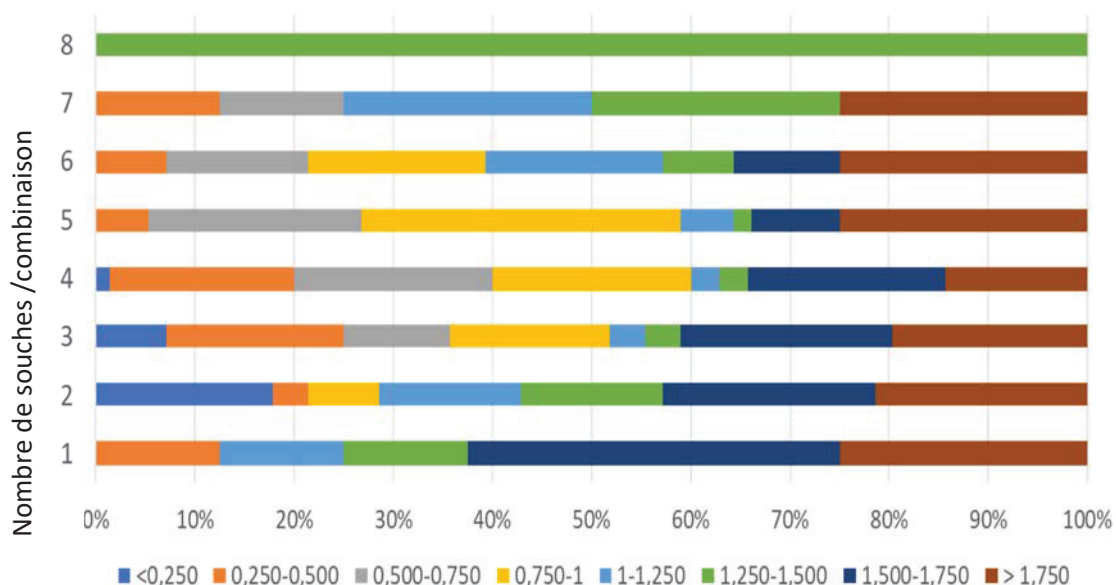


Figure 3 - Répartition des combinaisons, en termes d'activité d'inhibition de la germination de Fg, en fonction du nombre de souches par combinaison

Les répartitions (% , calculé pour chaque type de combinaison (par 1, 2, à 8 souches) en fonction du nombre de combinaisons présentes dans la classe par rapport au nombre total de combinaisons du type considéré) sont exprimées en fonction de la DO_{492nm} obtenue lors des tests en microplaque. Huit classes de DO ont été définies (de <0,250 à >1,750 avec 0,250 entre chaque intervalle).

Afin de mieux explorer les résultats obtenus, nous nous sommes concentrés sur les 20% des meilleures et des moins bonnes combinaisons, respectivement désignées Combi + et Combi -, et représentant 51 combinaisons pour chacune de ces classes (Tableau S1). Pour les Combi +, une moyenne de DO_{492nm} de $0,379 \pm 0,103$ a été obtenue alors que pour les Combi -, elle est de $1,907 \pm 0,09$. Sur les 51 combinaisons Combi + et les 51 Combi -, l'occurrence (exprimée en %) du nombre total de bactéries dans ces 102 combinaisons ainsi que le nombre de fois (exprimé en %) où chaque bactérie est retrouvée dans ces combinaisons ont été calculés et comparés à des valeurs théoriques (Figures 4a et 4b).

Pour le nombre de bactéries par combinaison, les valeurs d'occurrence théoriques sont de 3,14% pour 1 et 7 bactéries, de 10,98% pour 2 et 6 bactéries, de 21,96%, pour 3 et 5 bactéries, de 27,45% pour 4 et de 0,39% pour 8 bactéries. La valeur théorique de présence d'une bactérie dans une combinaison

est de 50%. Au regard des résultats obtenus, les combinaisons avec 3 bactéries sont plus retrouvées qu'attendues dans les Combi + alors qu'elles sont moins retrouvées qu'attendues pour les combinaisons avec 5 et 6 bactéries, ce qui laisse suggérer que les combinaisons avec 3 bactéries seraient plus propices à l'inhibition de la germination des spores. Parallèlement, les combinaisons par 4 sont moins retrouvées qu'attendues dans les Combi -, laissant penser qu'elles pourraient présenter plus d'activité d'inhibition de la germination qu'attendue. Au contraire, dans les Combi -, les combinaisons par 5 et 6 bactéries sont plus retrouvées qu'attendues, donc moins propices à l'inhibition.

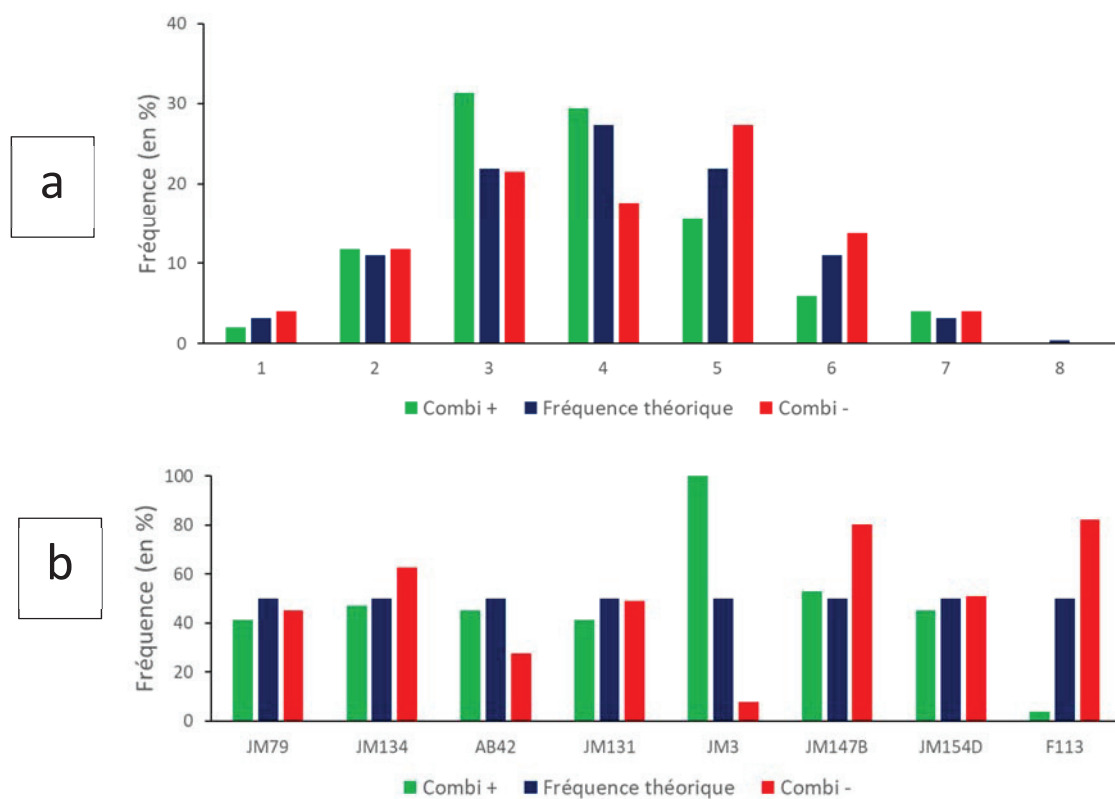


Figure 4 - Représentation des 20% des meilleures combinaisons (Combi +) et des 20% des moins bonnes combinaisons (Combi -) en fonction du nombre de bactéries au sein des combinaisons et selon les souches.

En a) sont représentées les fréquences de combi+ ou - en fonction du nombre de souches par combinaisons et en b) selon les souches étudiées. Les résultats sont exprimés en % et correspondent à des fréquences (ou occurrences). Ils sont comparés à des fréquences théoriques.

Au niveau de la répartition des souches, JM3 est la bactérie qui de nouveau apparaît la plus active. En effet, dans les Combi +, elle est présente dans 100% des 51 combinaisons, et seulement dans 7,8% des 51 combinaisons Combi -. Cette souche semble donc être la principale souche inhibitrice de la germination des spores. Au contraire, la souche F113 n'est présente que dans 3,9% des Combi + alors

qu'elle est présente dans 82,4% des Combi -. En ce qui concerne les autres souches bactériennes, JM134 et JM 147B sont plus retrouvées qu'attendues dans les Combi - avec respectivement 62,7 et 80,4% de présence alors qu'AB42 y est moins retrouvée qu'attendue, avec 27,5% de présence. Ces résultats confirment que les souches JM3 et AB42 sont les souches qui présenteraient le plus d'effet sur la germination des spores.

Pour détecter si des associations préférentielles entre souches bactériennes sont retrouvées parmi les combinaisons efficaces ou inefficaces vis-à-vis de l'inhibition de la germination des spores, une table permettant de visualiser l'association des souches a été réalisée (Tableau 1) pour la comparaison des Combi + et des Combi -. Pour calculer le taux d'association entre deux souches, le nombre de fois où les souches sont présentes ensemble dans une combinaison est divisé par le nombre de fois où les souches sont retrouvées (ensemble et/ou séparément) dans les 51 combinaisons Combi+ ou dans les 51 combinaisons Combi- (Ex : JM79 et JM134 sont retrouvées 37 fois dans les 51 combinaisons et sont associées 10 fois, d'où un taux d'association de 0,27). Plus le taux d'association est élevé, plus les souches sont associées entre elles dans les Combi + ou les Combi -. Les résultats montrent que les bactéries sont préférentiellement associées à JM3 dans les Combi + et à F113 dans les Combi -. Il peut être noté que la deuxième association la plus souvent retrouvée dans les Combi + est JM134-JM147B alors que l'association JM154D-JM147B est plus souvent retrouvée dans les Combi -, suivie de JM134-JM147B.

Tableau 1 - Taux d'association entre 2 souches dans les Combi + et dans les Combi -.

Les résultats pour les Combi + sont les cellules surlignées en vert, et ceux pour les Combi - sont surlignées en rouge.

	JM79	JM134	AB42	JM131	JM3	JM147B	JM154D	F113
JM79		0,270	0,257	0,265	0,431	0,270	0,314	0,000
JM134	0,341		0,270	0,314	0,490	0,441	0,324	0,038
AB42	0,233	0,270		0,229	0,431	0,306	0,314	0,091
JM131	0,314	0,366	0,258		0,431	0,343	0,250	0,043
JM3	0,080	0,125	0,056	0,037		0,510	0,471	0,039
JM147B	0,409	0,500	0,333	0,444	0,098		0,351	0,037
JM154D	0,351	0,405	0,273	0,351	0,107	0,545		0,040
F113	0,465	0,543	0,333	0,383	0,098	0,588	0,478	

Dans l'objectif de mieux caractériser ces associations, une table de probabilité d'association entre les souches a été construit (tableaux 2a et 2b) pour les Combi + et les Combi -. Chacun de ces tableaux se lit en ligne ce qui signifie que la probabilité affichée correspond à la probabilité de trouver la souche indiquée en colonne, en fonction de la souche indiquée en ligne (Ex : 0,4 est la probabilité de trouver la souche JM79 quand la souche JM134 est présente dans la combinaison). Dans les Combi +, la probabilité de trouver n'importe quelle souche associée à JM3 est de 1, signifiant qu'elle est présente dans toutes les combinaisons alors que les probabilités d'être associée à F113 sont inférieures à 0,1.

Dans les Combi -, 3 souches ont une probabilité importante d'être associée aux autres : F113, JM147B et JM134. Ce sont les souches qui sont le plus retrouvées dans les combinaisons Combi -. Au contraire, les souches JM3 et AB42 présentent des probabilités plus faibles d'être associées à d'autres bactéries dans les Combi -.

Tableau 2 - Probabilité d'association entre les souches dans les Combi + et les Combi -.

Les probabilités d'association sont présentées en a, pour les Combi + et en b pour les Combi -. Le gradient de couleur utilisé correspond aux probabilités d'association de deux souches dans une combinaison, avec des couleurs allant du rouge (pour une probabilité d'association faible) au vert foncé (pour une probabilité d'association forte). Le gradient de probabilité est établi de 0,2 en 0,2.

Combi +	JM79	JM134	AB42	JM131	JM3	JM147B	JM154D	F113
JM79		0,45	0,41	0,41	1,00	0,45	0,50	0,00
JM134	0,40		0,40	0,44	1,00	0,60	0,48	0,04
AB42	0,41	0,45		0,36	1,00	0,50	0,50	0,09
JM131	0,41	0,50	0,36		1,00	0,55	0,41	0,05
JM3	0,43	0,49	0,43	0,43		0,51	0,47	0,04
JM147B	0,38	0,58	0,42	0,46	1,00		0,50	0,04
JM154D	0,46	0,50	0,46	0,38	1,00	0,54		0,04
F113	0,00	0,50	1,00	0,50	1,00	0,50	0,50	

Combi -	JM79	JM134	AB42	JM131	JM3	JM147B	JM154D	F113
JM79		0,61	0,35	0,48	0,09	0,78	0,57	0,91
JM134	0,44		0,31	0,47	0,13	0,75	0,53	0,84
AB42	0,53	0,67		0,53	0,07	0,93	0,60	0,93
JM131	0,46	0,63	0,33		0,04	0,83	0,58	0,75
JM3	0,50	1,00	0,25	0,25		1,00	0,75	1,00
JM147B	0,44	0,59	0,34	0,49	0,10		0,59	0,76
JM154D	0,48	0,63	0,33	0,52	0,11	0,89		0,81
F113	0,51	0,66	0,34	0,44	0,10	0,76	0,54	

Discussion

De l'ensemble de ces résultats il apparaît que : i) la souche JM3 semble importante dans l'activité d'inhibition de la germination des spores et/ou de la croissance mycélienne en milieu liquide, ii) au contraire, la souche F113 semble très peu efficace dans cette inhibition et iii) il n'existerait pas d'association préférentielle d'autres bactéries avec JM3 qui favoriserait fortement l'inhibition de la germination des spores. Ces travaux constituent une étude préliminaire sur l'utilisation de combinaisons de bactéries dans la lutte contre *Fusarium graminearum*. A notre connaissance, aucun travail de ce type n'a encore été publié. L'utilisation de 8 bactéries n'est pas commune. La plupart des études sur les effets de consortium n'utilisent rarement plus de 3 acteurs (Sarma et al., 2015).

A l'heure actuelle, ces travaux ont permis de mettre en avant une souche relativement efficace *in vitro*, qu'elle soit seule, ou en combinaison, la souche *Bacillus amyloliquefaciens* JM3. Cette souche, qu'elle soit ou non associée à d'autres souches, conserve un fort effet inhibiteur de la germination des spores. De plus, en regardant les résultats bruts, il existe 10 combinaisons plus efficaces que la souche JM3

seule qui sont JM134-AB42-JM3, JM79-JM134-JM3, JM134-JM3, AB42-JM3, JM79-AB42-JM3, JM79-JM3, JM3-JM147B, AB42-JM3-JM147B, JM79-JM134-BaAB42-JM3 et JM131-JM3. Les 6 premières combinaisons ne font intervenir que 4 souches différentes : JM79, JM134, AB42 et JM3. L'association de ses souches pourrait donc être une voie intéressante à explorer vis-à-vis de la mise au point d'un inoculant sur le marché des produits du biocontrôle. Dans un premier temps, nous souhaiterions tester ces consortiums *in planta* afin de vérifier leur capacité à protéger le blé dans des conditions environnementales plus complexes. Avant d'envisager un produit, il sera nécessaire de comprendre les possibles interactions entre les différentes souches présentes dans le consortium ainsi que les interactions que ce consortium peut établir avec la plante conduisant à la protection vis-à-vis d'un pathogène ou bien d'un stress abiotique.

Parallèlement à ces travaux, nous avons également comparé sur milieux gélosés l'inhibition de la croissance de *Fg* entre des surnageants de combinaisons 'reconstitués' (c'est-à-dire en ajoutant des volumes égaux des surnageants de chaque souche cultivée seule) et des surnageants issus de cultures des souches cultivées en combinaisons (données non présentées). Ce travail a été réalisé pour les 10 combinaisons les plus efficaces indiquées ci-dessus. L'activité fut identique entre les surnageants issus des cultures des souches combinées entre elles et les surnageants reconstitués à partir des cultures des souches séparément. Ceci suggère que l'activité d'inhibition n'est pas le fruit d'une synergie entre souches bactériennes mais résulterait davantage de l'addition des métabolites produits par chaque souche. Des effets synergiques ont été retrouvés chez des *Pseudomonas* fluorescents capables de produire des phénazines dans un sol dit résistant, montrant l'importance des consortiums, pour contrôler l'infection par *Fusarium* (Mazurier et al., 2009). Chez l'hydre, un cnidaire, la restauration de son microbiote a permis la restauration de sa protection vis-à-vis d'un *Fusarium in vitro*. Quand les bactéries sont ajoutées une à une sur un hydre axénique, elles ne permettent pas une protection efficace, démontrant l'importance de mettre ensemble les différents acteurs (Fraune et al., 2015). Dans notre cas, des analyses complémentaires de type profilage métabolique seraient nécessaires pour comparer la composition métabolique de ces 2 types de surnageants (ceux issus des cultures en combinaisons vs. ceux issus de la combinaison des surnageants) et étayer notre hypothèse sur les effets d'inhibition de *Fg* qui pourraient davantage être le fruit d'une additivité que d'une synergie au sein des consortiums. Toutefois, comme vu dans le chapitre précédent, une activité *in vitro* d'un potentiel agent de biocontrôle ne garantit pas une activité *in planta*. Néanmoins, il est intéressant de noter que parmi les souches en combinaisons avec JM3 dans les combinaisons efficaces, les souches JM79 et JM134 ont été retrouvées. Ces deux souches étaient des souches qui présentaient des résultats *in planta* de protection et de stimulation de croissance du blé significatifs. Ces travaux devront être poursuivis avec une évaluation *in planta* de l'activité de protection du blé vis-à-vis de la

fusariose, afin d'étudier la capacité des combinaisons à protéger efficacement le blé contre *Fusarium graminearum*. Une étude similaire, impliquant un autre pathogène sur la tomate, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a été menée avec l'utilisation d'un consortium de 5 bactéries, chacune étant recrutée pour assurer une fonction différente, que cela soit de la phytoprotection ou de la phytostimulation (Kannan Vijayaragahavan and Sureendar Raman, 2008). Les résultats obtenus sont intéressants, même s'il aurait été important d'effectuer les mêmes expériences en effectuant toutes les différentes combinaisons de ces 5 souches possibles, afin d'évaluer la contribution de chaque bactérie dans les effets sur la plante. Il aurait aussi été intéressant d'aller jusqu'à une évaluation du rendement de culture des plants de tomates pour comparer les effets sur la fitness de la plante inoculée par les différents consortiums. Dans le cadre de notre travail sur la protection du blé contre *Fg*, il serait nécessaire de réussir à tester nos différentes combinaisons dans des *essais in planta*, où l'effet synergique pourrait être plus important que dans de simples tests *in vitro*.

Il serait aussi intéressant de mettre au point des outils qui rendraient possibles le suivi des populations de chaque souche en interactions avec le blé, par la réalisation de PCR en temps réel sur des gènes spécifiques de chaque souche s'ils existent ou suite au marquage de ces souches avec des marqueurs spécifiques. L'objectif de ces travaux serait de rechercher des associations capables de favoriser la survie du plus grand nombre de souches du consortium inoculé et de potentialiser l'effet de protection du blé. Il serait également intéressant de permettre des associations plurifonctionnelles, apportant à la fois des effets d'antagonisme direct sur les microorganismes phytopathogènes et à la plante différentes fonctions essentielles comme l'apport de nutriments ou la capacité à retenir l'eau. Pour étudier ces associations plurifonctionnelles, nous disposons des génomes des différentes souches, et il serait intéressant de regarder, quelles sont les différentes fonctions prédites codées dans ces génomes. Grâce à ces associations plurifonctionnelles, il est possible d'imaginer des cocktails bactériens capables de lutter contre plusieurs pathogènes, car à l'heure actuelle, la lutte biologique contre des nuisibles est souvent centrée sur un seul organisme. De plus, grâce à la mise en place par certaines souches de possibles effets ISR (Induced Systemic Resistance), il est possible d'envisager une lutte préventive.

Néanmoins, ces approches comportent plusieurs freins. Si les études *in vitro* fonctionnent souvent bien, les essais en champs avec l'utilisation de bactéries en lutte biologique restent souvent des échecs, car les sols sont des écosystèmes complexes et variés (Smyth et al., 2011). Le succès d'un essai au champ réside dans la capacité des souches utilisées à s'installer dans la communauté microbienne déjà présente. Malheureusement, à l'heure actuelle, nous ne sommes pas capables de prédire le succès d'installation d'une population dans un sol. L'utilisation de plusieurs souches dans un même

consortium peut permettre d'augmenter la probabilité qu'une des souches présentes dans ce consortium soit capable de s'installer dans le sol traité. Aujourd'hui, les communautés artificielles représentent un réel enjeu en agronomie, et au-delà de l'utilisation en tant qu'agent de lutte biologique, elles représentent un formidable outil pour nous permettre d'appréhender la complexité des interactions existant au sein des communautés microbiennes dans le sol.

Dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés à deux souches, JM3 et AB42, présentant une différence d'activité vis-à-vis de la germination des spores et/ou de la croissance mycélienne en milieu liquide de *Fg in vitro*. Ces deux souches présentent la particularité d'appartenir au même genre et donc d'être proche d'un point de vue taxonomique. Nous avons cherché à évaluer, par des approches de génomique et de métabolomique, quelles sont les différences d'éléments génétiques et métaboliques présentés par ces deux souches taxonomiquement proches, mais qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques phénotypiques vis-à-vis de *F. graminearum*.

Ce qu'il faut retenir de la partie

- ♣ Réalisation de tests d'inhibition de la germination des spores de *Fg* à partir de combinaisons de 8 souches ce qui fait un total de 255 combinaisons testées.
- ♣ JM3 est la bactérie la plus efficace, même en combinaison, et F113 semble être la bactérie la moins efficace. De plus, au-delà de 4 bactéries dans les combinaisons, l'efficacité décline.
- ♣ Les consortiums sont un véritable enjeu pour l'avenir des produits des biocontrôle.

Données supplémentaires

Tableau S 1 Listes de combinaisons retenues dans les Combi+ et les Combi – avec les souches associées.

Ce tableau a servi à la détermination des taux d'association entre 2 souches (tableau 1) ainsi qu'au calcul des probabilités d'association des souches retrouvées dans les Combi+ et les Combi- (tableau 2).

Combi +	JM3	JM1478	JM134	JM154D	AB42	JM131	JM79	F113	Combi -	F113	JM1478	JM134	JM154D	JM131	JM79	AB42	JM3	
JM134-AB42-JM3									JM134-JM3-JM1478-JM154D-F113									
JM79-JM134-JM3									JM134-AB42-JM131-JM154D-F113									
JM134-JM3									JM131-JM1478-JM154D-F113									
AB42-JM3									JM79-JM131-F113									
JM79-AB42-JM3									JM79-JM134-JM3-JM1478-JM154D-F113									
JM79-JM3									JM1478									
JM3-JM1478									JM79-JM134-JM131-JM1478-JM154D									
AB42-JM3-JM1478									F113									
JM79-JM134-AB42-JM3									JM79-JM134-JM131-JM3-JM1478-JM154D-F113									
JM131-JM3									JM134-JM131-JM1478									
JM3									JM134-JM131-F113									
JM134-JM3-JM1478									AB42-JM131-JM1478-JM154D-F113									
JM131-JM3-JM1478									JM79-AB42-JM131-JM1478-F113									
JM3-JM154D									JM79-JM1478-JM154D-F113									
JM79-JM3-JM1478									JM79-JM134-AB42-JM1478-F113									
JM79-JM134-JM3-JM154D									JM131-JM1478									
JM134-JM3-JM154D									JM79-JM131-JM1478-JM154D-F113									
AB42-JM3-JM1478-JM154D									JM1478-JM154D									
JM79-JM134-JM3-JM1478									JM79-AB42-JM1478-JM154D-F113									
JM79-JM131-JM3									JM79-JM134-JM131-F113									
JM134-JM131-JM3									JM1478-JM154D-F113									
JM79-JM131-JM3-JM1478									JM79-AB42-JM1478-F113									
AB42-JM3-JM154D									JM79-F113									
JM79-JM134-JM3-JM1478-JM154D									JM134-JM154D-F113									
JM134-JM3-JM154D									JM134-JM131-JM1478-JM154D									
AB42-JM3-JM1478-JM154D									JM134-AB42-JM1478-F113									
JM79-JM134-JM3-JM1478									JM79-AB42-JM131-JM1478-JM154D-F113									
JM79-JM3-JM154D									JM134-JM1478									
JM3-JM1478-JM154D									JM131-JM1478-F113									
JM79-JM134-AB42-JM3-JM1478-JM154D									JM131-JM1478-JM154D									
JM134-JM3-JM1478-JM154D									JM134-AB42-JM131-JM1478-JM154D-F113									
JM134-JM131-JM3-JM154D									JM134-JM131-JM3-JM1478-F113									
AB42-JM131-JM3									JM79-JM134-AB42-JM131-JM1478-JM154D-F113									
JM79-JM3-JM1478-JM154D									JM134-JM1478-JM154D									
JM79-JM134-AB42-JM131-JM3-JM1478-JM154D									JM79-JM134-JM154D-F113									
JM79-JM131-JM3-JM1478									JM79-JM134-JM131-JM1478-F113									
JM134-JM131-JM3-JM1478									JM79-JM134-F113									
JM79-JM131-JM3-JM154D									JM134-AB42-JM1478-JM154D-F113									
JM134-AB42-JM3-JM1478-JM154D									JM134-JM1478-JM154D-F113									
AB42-JM131-JM3-JM1478									JM1478-F113									
JM134-AB42-JM3-JM1478									JM79-JM1478-F113									
JM79-AB42-JM131-JM3									JM79-JM134-AB42-JM1478-JM154D-F113									
JM134-AB42-JM3-JM154D									JM79-JM134-JM131-JM1478-JM154D-F113									
AB42-JM3-F113									JM134-F113									
JM79-AB42-JM131-JM3-JM1478-JM154D									JM79-JM134-JM1478-F113									
JM134-AB42-JM131-JM3-JM1478									JM134-JM131-JM1478-F113									
JM134-AB42-JM131-JM3-JM1478-JM154D-F113									JM134-JM131-JM1478-JM154D-F113									
AB42-JM131-JM3-JM1478-JM154D									JM79-JM134-JM1478-JM154D-F113									
JM79-AB42-JM3-JM1478-JM154D									JM79-JM134-JM1478-JM154D-F113									
JM131-JM3-JM154D									JM79-JM134-AB42-JM131-JM1478-F113									
JM79-JM134-JM131-JM3-JM1478									JM134-AB42-JM131-JM1478-F113									
JM79-JM134-JM131-JM3-JM154D									JM134-JM1478-F113									

Chapitre 9 – Approche comparative pour déterminer les molécules inhibitrices de JM3 (publication en cours de rédaction)

Deciphering the antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strain JM3 by coupling comparative genomics and metabolomics approaches

Yoann Besset-Manzoni^{ab}, Marjolaine Rey^a, Gilles Comte^a Pierre Joly^b, Claire Prigent Combaret^a

^aUMR Ecologie Microbienne, CNRS, INRA, VetAgro Sup, UCBL, Université de Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France

^bBiovitis, Le Bourg, 15 400 Saint Etienne-de-Chomeil, France

Keywords

Apo-carotenoid, *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol agent, *Fusarium graminearum*, wheat, spore germination inhibition

Abstract

Pesticides are one of the first defense weapons against pathogens and pests. But, in recent years, there has been increased global awareness about the dangers of using chemical inputs in agriculture, particularly pesticides. To reduce the use and impact of pesticides, alternative methods are explored, and in particular the use of microorganisms as a pest control agent. Microorganisms are known to produce antifungal metabolites, especially those belonging to the genus *Bacillus*. Indeed, this genus is known to produce a broad spectrum of antimicrobial molecules, such as lipopeptides (surfactins, fengycins ...). During our study, we were interested in two strains of *Bacillus amyloliquefaciens*, JM3 and AB42. These two strains have the particularity of having different inhibition phenotypes with respect to the germination of *Fusarium graminearum* spores. To understand why and how two phylogenetically close strains expressed a different inhibition phenotype, metabolomics and genomics approaches were combined to compare the 2 *B. amyloliquefaciens* strains.

A differential production of metabolites belonging to the apo-carotenoid family were observed between the 2 strains. Using a bioguided fractionation of the culture supernatant of JM3, it was

evidence that the fractions containing the apo-carotenoids correspond to the fractions that share the inhibition activity on the germination of *Fg* spores. However, further secondary metabolite purification and chemical characterization studies have yet to be done to confirm the antifungal function of apo-carotenoids. If these studies are conclusive, this would be, to our knowledge, the first time that an antifungal activity would be associated to *Bacillus* apocarotenoids, and this would open the field to new potential methods to control fungi, both in agriculture and in human health.

Introduction

Crop production is affected by many fungal soil-borne pathogens that cause severe diseases (Katan et al. 2017). Chemical pesticides are efficient but their use is now questioned due to their potential negative impacts on ecosystems and human health. In the rhizosphere of crops, plant-protective bacteria from several species can protect the plant against those pathogens (Raaijmakers et al., 2009). These biocontrol agents occupy an important place in the control of plant pathogen populations. Indeed, these microorganisms are able to compete directly or indirectly with plant pathogens to reduce their incidence and thus may reduce the risk of crop diseases. Direct antagonism implies a close contact between the biocontrol agent and the pathogen and functions like predation, hyperparasitism or the synthesis of antimicrobial compounds or lytic enzymes (Pal and McSpadden Gardener, 2006). Indirect antagonism involves either competition for an ecological niche or for nutrients such as iron, or induction of resistance in the host plant (Pal and McSpadden Gardener, 2006).

Direct antagonism through the synthesis of secondary metabolites with antifungal properties is the most commonly referenced work in the literature (Tyc et al. 2017). They are either volatile or soluble compounds. Assays to evaluate the antimicrobial activity of microbial strains are often simple to implement *in vitro*, by means of a direct confrontation or co-culture between the potential biocontrol agent and the pathogen on agar Petri plates. These methods have been used for a very long time and have already allowed to isolate and characterize many pathogen-antagonistic bacteria (Weller, 1988). Among the most commonly found genera is the genus *Bacillus*. The genus *Bacillus* is a well-represented genus in agricultural soils, so it is very interesting to look at its potential as a biocontrol agent (Kumar et al., 2011; McSpadden Gardener, 2004). Many studies involving the use of *Bacillus* as a biocontrol agent can be found in the literature (Arguelles-Arias et al., 2009; Jacobsen et al., 2004; Leifert C. et al., 2008; Santoyo et al., 2012). Regarding the biocontrol of *Fusarium*, studies are not lacking, whether in cotton (Chen et al., 1995), maize (Cavaglieri et al., 2005), banana (Wang et al., 2013), cucumber (Li et al., 2012) or even lentils (Akhtar et al., 2010).

The biocontrol of *Fusarium graminearum* (*Fg*) by *Bacillus* is also well documented in the literature (Khan et al., 2001; Palazzini et al., 2007; Schisler et al., 2002). *Bacillus* strains have several advantages enabling them to be very good candidates as biocontrols agents. Firstly, *Bacillus* strains are able to sporulate. Spores allow bacterial survival in an unfavorable environment, and in the case of inoculant preparation, spores might be preserved during long term. Secondly, *Bacillus* are known to produce a large number of secondary metabolites, and in particular cyclolipopeptides (Ongena and Jacques, 2008). These cyclic lipopeptides are excellent antimicrobials such as bacillomycin, fengycin, surfactin, iturin, mycosubtilin or zwittermicin A (Arguelles-Arias et al., 2009; Leclère et al., 2005; Pal and McSpadden Gardener, 2006). Some of them like surfactin and fengycin are also able to induce plant systemic resistance (Ongena and Jacques, 2008). In addition, *Bacillus* strains are also able to produce enzymes such as chitinase that breaks down the cell wall of fungi (Zhao et al., 2014).

In the present study, we were therefore interested in characterizing the biocontrol activity of two *Bacillus amyloquefaciens* strains, JM3 and AB42, at a molecular level. These 2 strains were both able to inhibit the mycelial growth of *F. graminearum* *Fg1* on Petri plates but only one, JM3, was able to suppress the germination of *Fg* spore and/or its mycelial growth in liquid medium. However, both strains were able to protect the growth of wheat against *Fg*, with more or less effectiveness. Metabolic profiling and bioguided fractionation approaches were thus implemented to compare their secondary metabolism and characterize which compounds might be involved in their biocontrol activity against *Fg*. With this approach, we aimed to understand what are the metabolic differences between two strains that are taxonomically close to each other, but which do not express the same *Fg* growth inhibition activities. We also wanted to ask the question whether secondary metabolism profiling and bioguided fractionation can optimize the selection of best bacterial candidates as biocontrol agents against fungal pathogens.

Materials and Methods

Biological materials

Two *Bacillus amyloquefaciens* strains were used in this study: *B. amyloquefaciens* AB42 and JM3. They were conserved at -80°C in glycerol. *Fusarium graminearum* *Fg1* spores were prepared as described by Florence Cambon et al (personal communication, see M&M Chapter 10) and conserved at -80°C in water.

DNA extraction

DNA extraction was done from overnight cultures of AB42 and JM3 using the NucleoSpin Microbial DNA kit (Ref – 740235.50, Macherey-Nagel, Hoerd, France). Genomic DNAs were sequenced at Mr DNA (Shallowater; USA). Genome sequencing was performed using MiSeq Illumina technology generating 2x300 bp paired-end library. Sequences were trimmed and used for *de novo* assembling with using the NGen DNA assembly software by DNASTar, Inc. The genome annotation was done with the online MicroScope platform (Vallenet et al. 2017). The final draft assemblies contain 28 contigs for JM3 and 32 contigs for AB42. The maximum length of the contigs were 1.13 Mbp bp for JM3 and 1.42 Mbp for AB42. The total genome length was of 4.16 Mbp for JM3 and 3.90 Mbp for AB42, and average GC contents are of 45.93 % for JM3 and 46.54 % for AB42. Specific and common Coding DNA sequences (CDS) between JM3 and AB42 were identified using the MicroScope gene families (MICFAM) parameters 80% amino acid identity on 80% alignment coverage, computed with the SiLiX software (Miele et al., 2011). AntiSMASH was used for the prediction of potential secondary metabolites produced by JM3 and AB42 (Weber et al. 2015).

Chemical extraction of culture supernatants of JM3 and AB42

Two different types of chemical extraction were performed on *Bacillus* strains' culture supernatants. The first one was realized on 20mL of culture supernatant in glass tubes and the second one, on 500mL of culture supernatant in a separating funnel. For the first extraction, 20mL of TSB (Tryptone Soya Broth) were inoculated with 1mL of JM3 or AB42 overnight culture ($OD_{600}=1$) and incubated for 24h at 28°C. For the second extraction (for fractionation studies), 500mL of TSB were inoculated with 2mL of overnight culture ($OD_{600}=1$) of JM3 and incubated for 48 to 72h at 28°C. Before the chemical extractions, cultures were centrifuged at 4500rpm during 10 min. The supernatants were recovered and extracted with ethyl acetate (GPR Rectapur VWR), in the proportion 1:1 (v/v). In each case, two consecutive extractions were performed. For the 20mL extraction, separation was obtained by centrifugation after vigorously shaking the tubes to mix supernatants with ethyl acetate. For the 500mL extraction, separation was obtained by decantation after softly shaking the separating funnel to mix the JM3 supernatant with ethyl acetate. Ethyl acetate was evaporated at 45°C on a rotary evaporator (RE 111 Rotavapor, Büchi, Rungis, France). The remaining liquid was then dried with a Centrivan Concentrator (Labconco, USA). Extracts were then solubilized in methanol 100%.

UHPLC-Q-TOF analysis

Supernatant extracts and bioactive fractions were analysed on an UHPLC Agilent 1290 coupled to an Accurate-Mass Q-TOF 6530 spectrometer (Agilent Technologies). Liquid chromatography was carried out using a Poroshell 120 EC-C18 column (2.7µm particle size, 100mm x 3mm, Agilent technologies) at 40°C and with injection of 3 µL of sample at a concentration of 10 mg/mL. UHPLC analyses were performed with a flow rate of 0.7 mL/min using formic acid 0.4% (v/v) in ultrapure water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The separation was achieved as follow: 90/10 (A/B) from 0 to 0.5 min, decreasing to 64/36 (A/B) from 0.5 to 4.5 min, decreasing to 0/100 (A/B) from 4.5 to 8.5 min, and then remaining to 0/100 (A/B) from 8.5 to 10.5 min. It is then followed by a return to the start condition in 0.5 min and equilibration for 3 min. Mass analyses were obtained with the ion source ESI Agilent Jet Stream Technology in positive mode, with nebulizer gas (Nitrogen) at a flow of 10L/min and 40psig pressure. The capillary tension was 3000 Volts and gave ionisation energy of 100 V. Chromatograms were explored at 280 nm with the Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 software (Agilent Technologies).

JM3 culture supernatant fractionation studies

Cell-free supernatant of JM3 was extracted with ethyl acetate from 500mL of culture. The extract was dried and 144 mg of dry extract was obtained. This 144 mg of dry extract was submitted to semi preparative HPLC on a HP 1100 system. The extract was dissolved in methanol (v= 3.6 mL) at a concentration of 40 mg/mL and injected (36 injections of 100µL in total). The column used was a Macherey Nagel VP C18 Nucleodur Sphinx RP (5 µm particle size, 250 mm x 10mm; Macherey-Nagel). HPCL analyses were performed at 40°C with a flow rate of 3.4 mL using formic acid 0.4% (v/v) in ultrapure water (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B) (VWR, Proplabo Hipersolv Chromanorm). The gradient was 90/10 (A/B) to start, 60/40 (A/B) from 0 to 4 min, 54/46 (A/B) from 4 to 11 min, and 0/100 (A/B) from 11min to 16min. The 0/100 (A/B) ratio was kept during 4 min, before returning to the start condition in 1 min and equilibrating for 6 min. 7 HPLC fractions were collected (from F1 to F7), with F1 being collected from 3 min to 7 min, F2 from 7 to 10 min, F3 from 10 to 12 min, F4 from 12 to 14 min, F5 from 14 to 16 min, F6 from 16 to 18 min and F7 from 18 to 20 min. Each fraction was dried with a Centrivap Concentrator (Labconco, USA).

Biological activity of extracts or fractions against *Fusarium graminearum*

Two assays were performed to evaluate the biological activity against *F. graminearum* of culture supernatants of JM3 and AB42, of their total extracts and/or of the JM3 HPLC-fractioned extracts, in *in vitro* conditions. One assay was made to evaluate the ability of total or fractioned extracts to inhibit the mycelial growth of *Fg1*, and the second one was performed to test their ability to inhibit the

germination of *Fg1* spores. The first assay was performed on PDA agar plates. Supernatants or methanol-solubilized extracts (10 μ L) were placed 2 centimeters apart from the center of the plate. A 6mm-diameter agar plug with mycelium from the leading edge of 5 day-old culture of *Fg1* grown on PDA was placed on the center of the plate, and incubated in the dark for 5 days at 28°C. The second assay was performed in microtiter-plates as described in Besset-Manzoni et al. (chapter VII) with the following adjustments. Indeed, in order to avoid the inhibition of spore germination by high methanol concentrations, methanol extracts (10 μ L) were diluted in PDB (Potatoes Dextrose Broth, to a final volume of 100 μ L) before introducing them in the wells of the micro-titer plate. Then 100 μ L of PDB (Potato Dextrose Broth, Conda Pronadisa) and 50 μ L of *Fg1* spore suspension at 10⁴ spores/mL were added. After 5 days of culture at 28 °C, the turbidimetry was measured at 492 nm in each well using an Infinite M200 Pro microplate reader (TECAN, Switzerland). For each test, three replicates were made.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with R software. The retention times of each peak in the chromatograms (at 280nm) were aligned and their relative intensity recorded in a matrix. Relative intensity values of compounds were compared between JM3 and AB42 using the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$).

Results

Comparison of secondary metabolic profiles of JM3 and AB42

The UHPLC secondary metabolic profiles of JM3 and AB42 were quite similar. However, for retention times between 5 and 7 min, some differences were observed (Figure 5). Indeed, from 5 to 6.3 min metabolites were more intensely produced by JM3 than by AB42, while the opposite was observed for compounds present from 6.3 to 7 minutes on the chromatograms obtained with the UHPLC method. To compare the JM3 and AB42 profiles, area under the curve were integrated for each peak. In addition, compounds from the culture medium TSB, were removed from the analysis as common to all profiles. We thus obtained a total of 145 compounds. Among these 145 compounds, 58 were found to be differently expressed between JM3 and AB42 and 37 of them had retention times between 5 and 7 min. Among these 37 compounds, 18 were significantly more produced by AB42, and 19 by JM3 (Table S1).

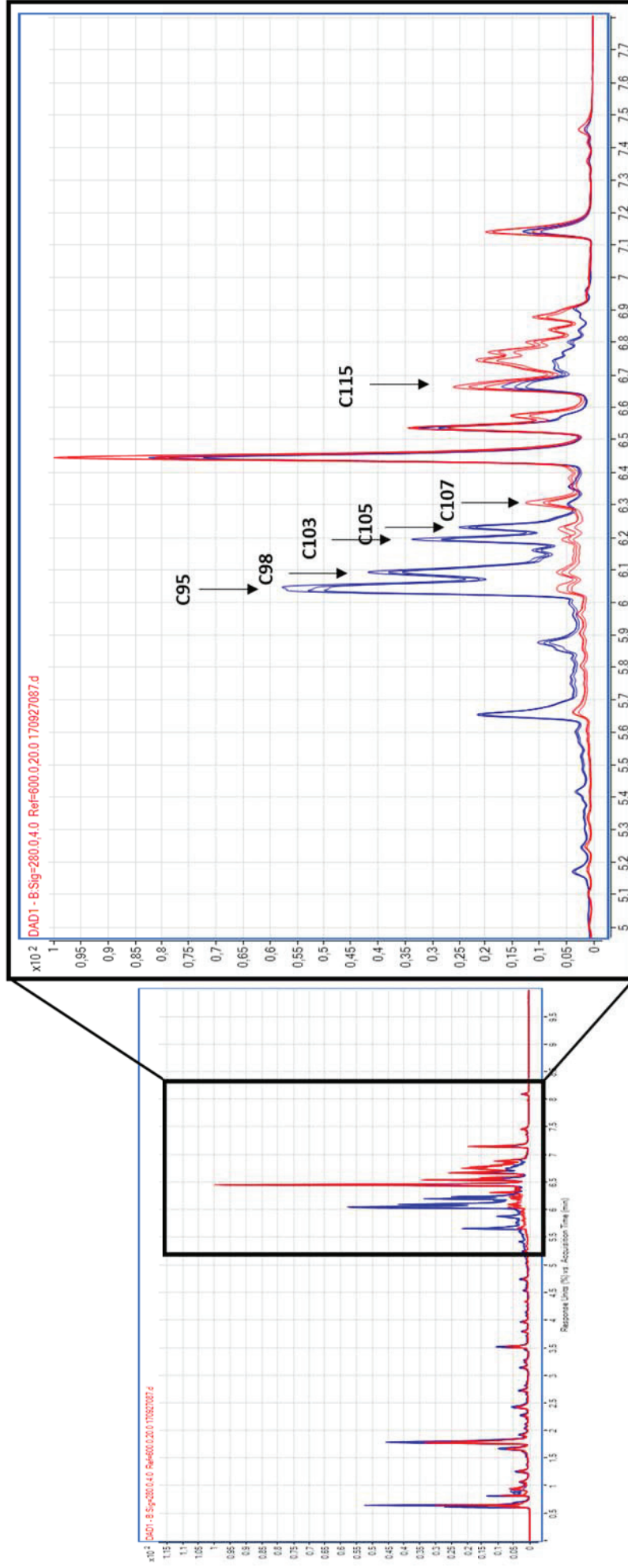


Figure 5 - UHPLC-Q-TOF chromatograms recorded at UV=280 nm of culture supernatant of strains JM3 (blue) and AB42 (red) after their ethyl acetate extraction.

A focus on retention times ranging from 5 to 7 min was shown on the right, in the insert. Are indicated with an arrow compounds of interest. These compounds are found in fractions 4 and 5, recovered from the semi preparative HPLC method.

Bio-guided fractionation studies to isolate compounds with antagonist activity against *F. graminearum*

In order to identify if some of the discriminant compounds can be responsible for the spore germination inhibition activity recorded in JM3 and not in AB42, a bio-guided fractionation approach was developed on the culture supernatant of the JM3 strain. Seven different fractions were collected by semi-preparative HPLC, with the aim to individualize the larger peaks observed in the UPLC-Q-TOF method within different fractions. Especially, three fractions were collected that correspond to molecules with retention times between the 5 and 7 minutes on the chromatogram of the UPLC-Q-TOF method : F3 for collecting molecules with retention times between 5 and 6 min, F4 between 6 and 6.4 min and F5 between 6.4 and 7 min (Figure 6). While in the first two fractions (F1-F2) as well as the last fraction (F7), no peaks were found in common between several fractions, some compounds can be found, at different concentrations, inside several fractions, F3, F4, F5 and/or F6 (Figure 6). After the fractionation process, 58.4 mg of material were recovered out of the 144 mg of the starting extract, resulting in a fractionation yield of about 41%.

Biological tests were carried out with all the 7 fractions on both the inhibition of *F. graminearum* mycelial growth on agar medium and spore germination in liquid medium. On agar plate, 4 fractions, F3, F4, F5 and F6 showed an inhibition activity against *Fg*. A lower inhibition activity of F3 when compared to the 3 other fractions was however observed. Fungal growth was strongly reduced all around the plug inoculum in presence of the F6 fraction (Figure 7). In liquid medium, the same 4 fractions showed an inhibition activity against *Fg*, However, F3, F4 and F5 have a similar activity against *Fg* while the activity of F6 is lower (Figure 8).

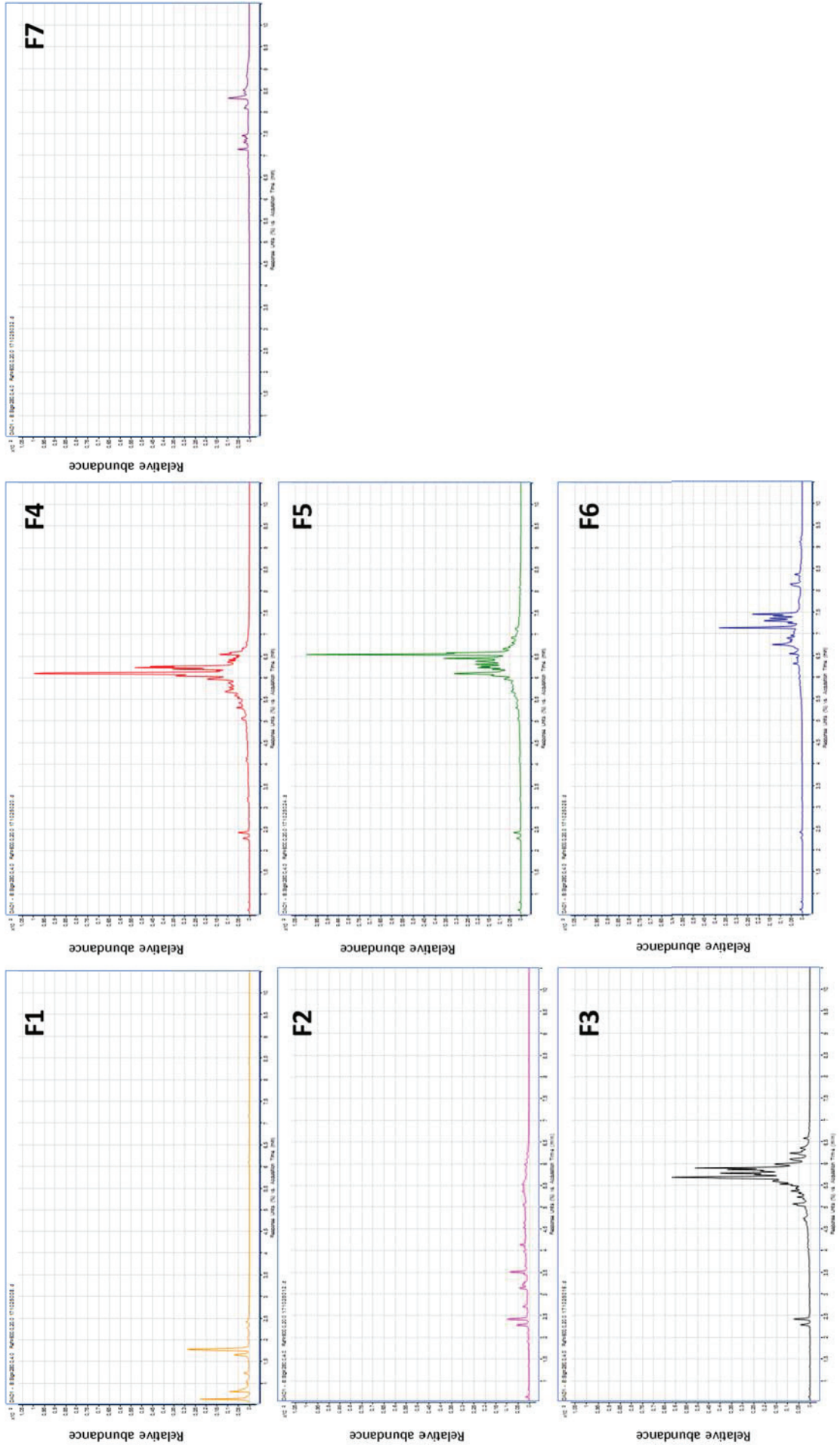


Figure 6 - UPLC-Q-TOF chromatograms recorded at UV=280 nm of each fraction obtained by the bio-guided fractionation of the supernatant culture of JM3 by semi-preparative HPLC

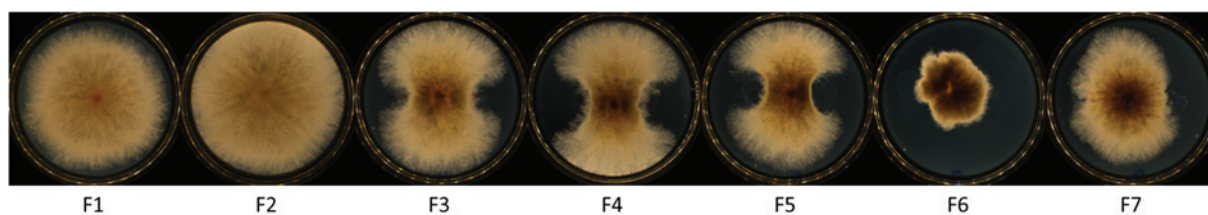


Figure 7 - *In vitro* evaluation of the *Fg* mycelial growth inhibition activity of each fraction.

For each fraction, methanolic extracts (10 μ L at 7mg/mL) were deposited on both sides of a *Fg* fungal plug on a PDA Petri plate. Photographs were taken after 3 days of culture.

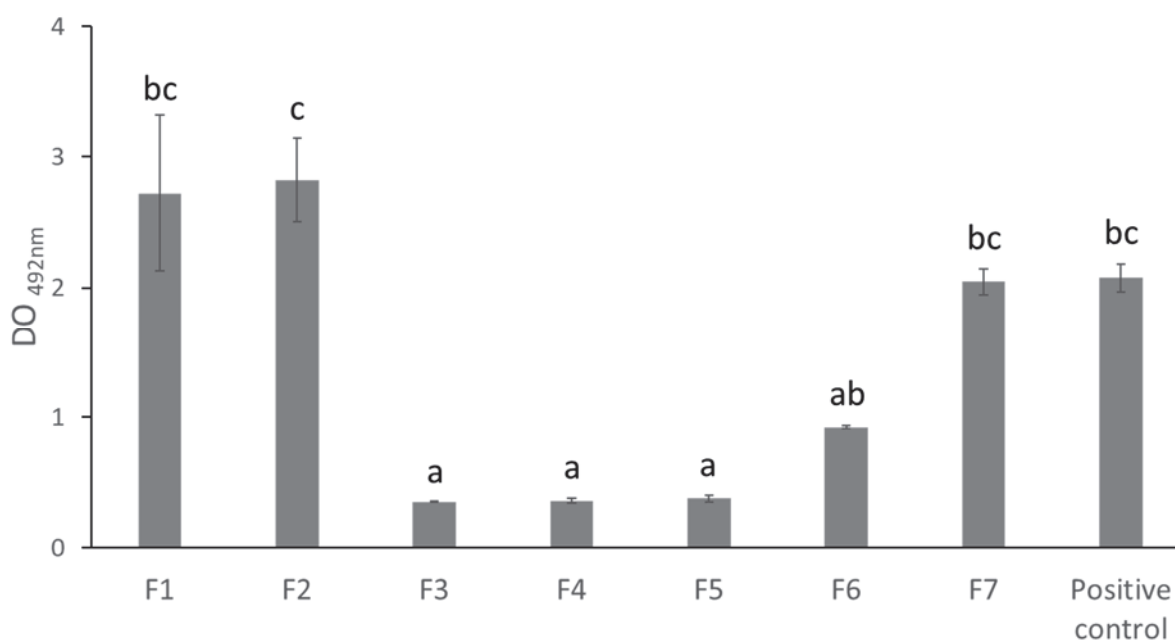


Figure 8 - *In vitro* evaluation of the *Fg* spore germination inhibition activity of each fraction.

For each fraction, methanolic extracts (10 μ L at 7mg/mL) were added to 10⁴ spores/mL of *Fg* in PDB liquid medium in microplate. After 5 days of incubation at 28°C, the turbidimetry was measured at 492 nm. Different letters reflect significant differences between spore germination inhibition activities of the fractions (Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$)).

Chemical characterization of secondary metabolites from bioactive fractions

The active fractions F3, F4, F5 contain molecules differently produced between JM3 and AB42. UV and MS spectra allowed us to characterize 6 of these differentially produced molecules between JM3 and AB42 (Table 3, Figure 9). Compounds C95, C98, C103 and C105 were more produced by JM3 than AB42, and C107 and C115 by AB42 than JM3. Compounds C95 and C103 might be isomers with molar mass of 742 g.mol⁻¹ and compounds C98 and C105 might correspond both to 2 co-eluted compounds with M of 742 g.mol⁻¹ and 744 g.mol⁻¹. Co-eluted compounds C98 and C105 may differ of 2 hydrogens and plausibly of one double bond. Compounds C107 and C115 have molar mass of 582 and 580 g.mol⁻¹ respectively, and plausibly differ of one double bond. Thus, it seems that there are 4 isomers with a

mass of $742 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (C95, co-eluted C98 compound, C103, co-eluted C105 compound) and 2 with a mass of $744 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (co-eluted C98 and C105 compounds).

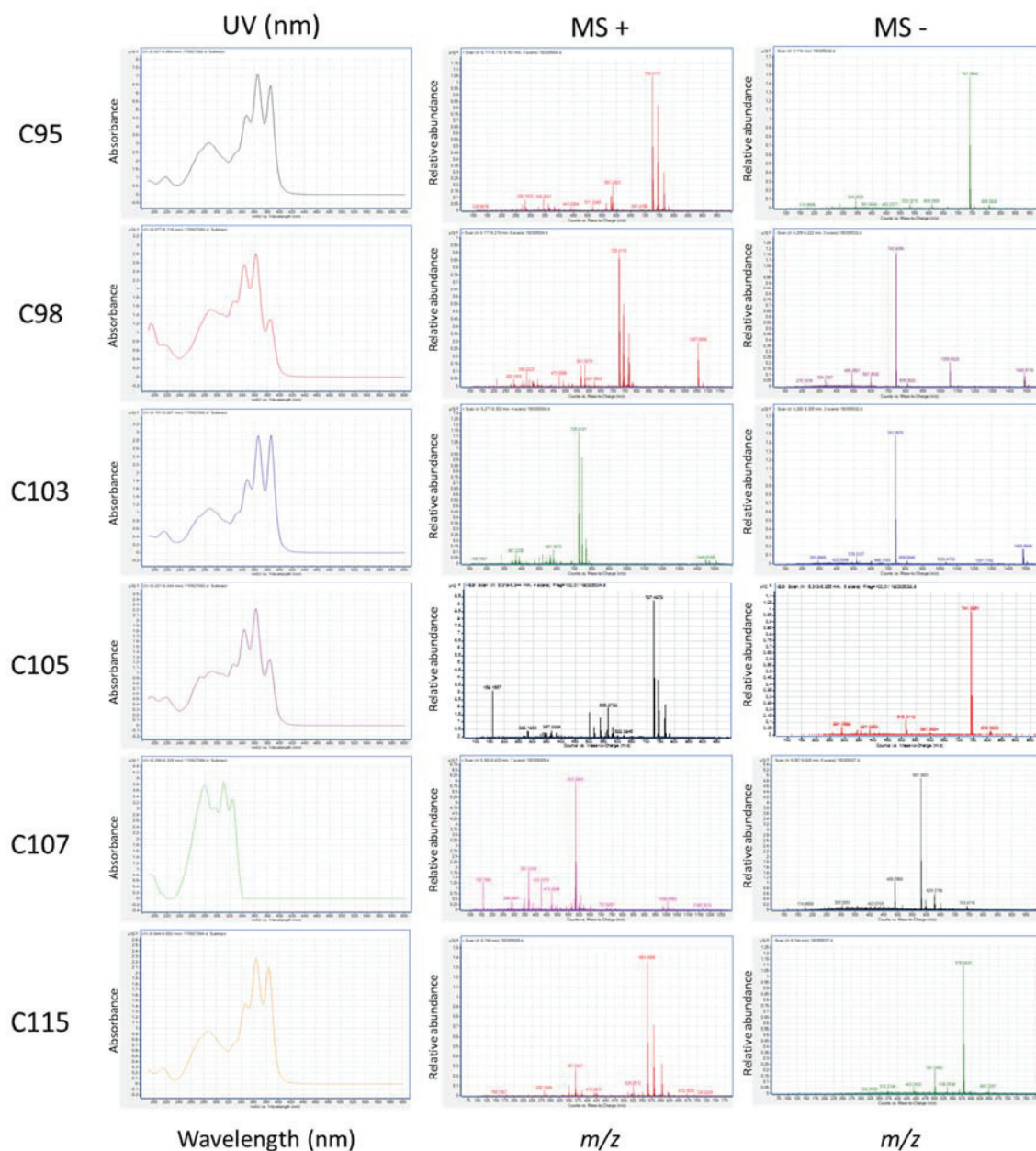


Figure 9 - UV spectrum and ESI-MS (positive and negative) for each compound of interest.

In addition MS fragmentation of compounds C95, C98, C103 and C105 leads to the release of a fragment of 162 which corresponds to a hexose. It appears that compounds C95, C103 and co-eluted compounds C98 and C105 might derive from compound C115 and co-eluted compound C98 and C105 might derive from compound C107. All these compounds have UV spectra that share common spectral characteristics: for C95, C103 and C115, common spectral peaks are 286/288 nm-346/348 nm-364/365/366 nm-384/386 nm; for C98 and C105 common spectral peaks are 290/292 nm-326nm-

344nm-362nm-384nm. For C107 the spectral peaks are 280nm-296nm-310nm-324nm (Figure 9). All together these information suggest these 6 compounds might belong to the same chemical family that might be close to apo-carotenoids compounds. Moreover, C105 and C107 might be aglycon derivatives while C95, C98, C103 and C105 might be glycosylated compounds.

Table 3 - MS spectral data for the 6 main compounds differentially produced by JM3 and AB42

Compound number	UV (nm)	MS +	MS -	Single (S) or co-elution (CO)	Retention time (min)
C95	286-348-365-386	743	741	S	6,037
C98	290-326-344-362-384	743-745	741-743	CO	6,091
C103	288-348-366-386	743	741	S	6,193
C105	274-292-326-344-362-384	743-745	741-743	CO	6,23
C107	280-296-310-324	583	581	S	6,304
C115	288-346-364-384	581	579	S	6,665

Comparison of JM3 and AB42 draft genomes

Draft genome sizes of JM3 and AB42 are of 4.16 Mbp and 3.90 Mbp, respectively, and contain 4301 and 3834 CDS (Coding DNA Sequence) or CDS fragments (Table S2) that are overall similarity distributed between JM3 and AB42 among the different COG classe (Table 4). When we compared the CDS from JM3 to that of AB42, 757 out of 4301 (17.60%) were found specific to JM3 (Figure 10). In AB42, 305 CDS out of 3834 (7.96%) were found specific to this strain.

Table 4 - Comparison of CDS numbers from JM3 and AB42 according to their COG classes

Process	COG class ID and description	JM3		AB42	
		Number of CDS	% of total CDS	Number of CDS	% of total CDS
Cellular Processes and signalling	D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	53	1.232 %	49	1.2780 %
	M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis	192	4.464 %	181	4.7209 %
	N: Cell motility	61	1.418 %	59	1.5389 %
	O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	110	2.557 %	107	2.7908 %
	T: Signal transduction mechanisms	163	3.790 %	163	4.2514 %
	U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	52	1.209 %	53	1.3824 %
	V: Defense mechanisms	64	1.488 %	60	1.5649 %
Information storage and processing	W: Extracellular structures	1	0.023 %	0	0 %
	B: Chromatin structure and dynamics	1	0.023 %	1	0.0261 %
	J: Translation, ribosomal structure and biogenesis	170	3.953 %	166	4.3297 %
	K: Transcription	325	7.556 %	328	8.5550 %
Metabolism	L: Replication, recombination and repair	171	3.976 %	154	4.0167 %
	C: Energy production and conversion	186	4.325 %	180	4.6948 %
	E: Amino acid transport and metabolism	389	9.044 %	386	10.0678 %
	F: Nucleotide transport and metabolism	90	2.092 %	80	2.0866 %
	G: Carbohydrate transport and metabolism	298	6.929 %	284	7.4074 %
	H: Coenzyme transport and metabolism	130	3.023 %	127	3.3125 %
	I: Lipid transport and metabolism	132	3.069 %	127	3.3125 %
	P: Inorganic ion transport and metabolism	246	5.720 %	239	6.2337 %
Poorly characterized	Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	154	3.581 %	134	3.4950 %
	R: General function prediction only	532	12.369 %	509	13.2760 %
	S: Function unknown	318	7.394 %	300	7.8247 %

Among the CDS and CDS fragments specific to JM3, 71.6% correspond to proteins of unknown functions or hypothetical proteins (Table S3). The second main class of JM3-specific proteins are enzymes (11.89%) and CDS of extra-chromosomal origin, in particular from phages (4.76%). The content of CDS from phage origin is even higher (14.40%) as some of them belong to other classes, i.e. enzymes, membrane proteins, regulators or proteins of unknown functions. Among specific genes, some are involved in the biosynthesis of the secondary metabolite Ericin_A (cluster 15, Table 5) with biosynthesis genes *spaBCS*, its transport *spaT*, *srtF*, *eriE/spaE* and the gene labelled JM3_v1_60153, regulation of its biosynthesis, with the regulator *spaR*, and the sensor histidine kinase *spaK*, and the putative *eril/spal* (signal).

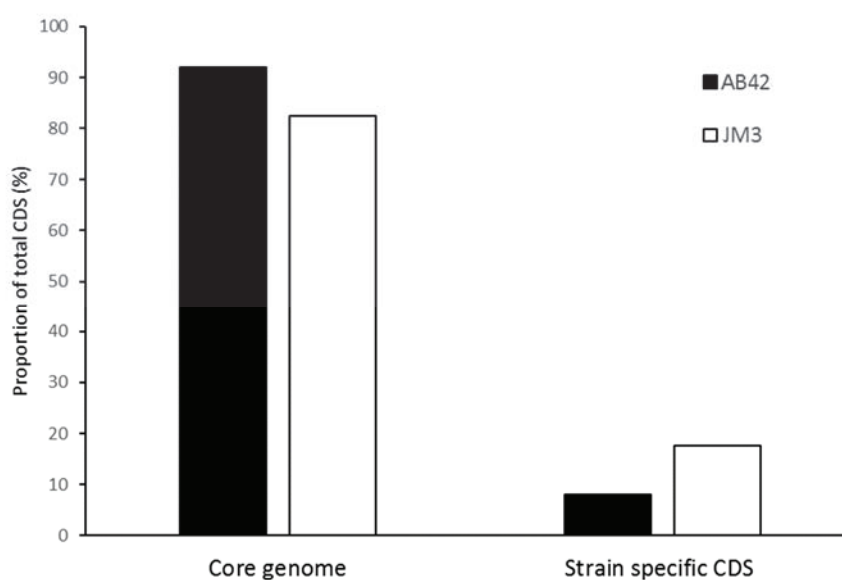


Figure 10 – Comparison of the proportions of total CDS in core-genome and in the variable genome between JM3 and AB42.

In addition, another NRPS (JM3_v1_30002) corresponding to cluster 7 is also specific to the JM3 genome. Fifteen other clusters involved in the biosynthesis of secondary metabolites were found in the JM3 genome, but are not specific of JM3 (Table 5). They are involved in the potential biosynthesis of macrolactin (cluster 3), bacillaene (clusters 1 and 4), iturin (cluster 5), difficidin-like compounds (clusters 6 and 9), bacilysin (cluster 8), balhimycin-like compound (cluster 10), fengycin precursor compound (cluster 12), surfactin (cluster 14), siderophore (cluster 16), and terpenes (clusters 2 and 11). For two other clusters (clusters 13 and 17), no potential secondary metabolites were associated to the set of genes present in these clusters. The *farP* and *sqhC* main relevant genes found in cluster2 and 11 are also present in the genome of AB42, and might be involved in the production of the aglycon compounds C105 and C107.

Table 5 - Clusters involved in the biosynthesis of secondary metabolites detected in JM3 genome (using AntiSMASH prediction)

Clusters	Begin - end of the cluster core (bp)	Size of the core (bp)	Relevant genes present in the cluster	Potential product synthesized	Identical cluster in AB42 (Yes/No)
cluster 1	84284 - 85528	1245	<i>pkSF</i>	Decarboxylase converting malonyl-S-AcpK to acetyl-S-	Yes
cluster 2	198222 - 198962	741	<i>farP</i>	AcpK for bacillaene-related polyketide synthesis	Yes
cluster 3	538291 - 584183	45893	<i>pkS-E, minCH1</i> and 5 other genes encoding type I Trans-AT PKS	Farnesyl diphosphate phosphatase	Yes
cluster 4	853583 - 916254	62672	<i>pkBCDEGHJLMNR, acpK</i>	Macrolactin	Yes
cluster 5	1014030 - 1084796	70767	<i>xynCD, mycABC, fenF, scoAB, bioI, bioIBDFKW, ideEFGJI, ideH_μ, igeH_β, yngABCKL, ppsE, yxjCF</i>	Bacillaene Elurin	Yes
cluster 6	1084958 - 1113258	28301	<i>difC, pkS-E, yqjBCDELM</i> , and genes encoding 2 NRPS-like proteins, 1 Type I Trans-AT PKS, 1PKS/NRPS-like protein	Difficidin-like	Yes
Cluster7	1707399 - 1747413	40015	gene encoding a NRPS (YBM3_v1_30 002)	Un-determined	No
cluster 8	1969343 - 1970761	1419	<i>bacABCD, ywfAGH, ydgK</i>	Bacilysin	Yes
cluster 9	2297523 - 2332439	34917	<i>dfnI, pkSGI</i> , and genes encoding 3 other Type 1 Trans-AT PKS and 1 PKS/NRPS-like protein (<i>yqjQ</i>)	Difficidin-like	Yes
cluster10	2616661 - 2617761	1101	<i>bpsAB</i> (Type 3 PKS - <i>alkylpyrone synthase</i>)	Balhimycin-like	Yes
cluster11	2712155 - 2714038	1884	<i>sqhC</i> (squalene-hopene cyclase, sporulenol synthase)	Terpene (spore protection)	Yes
cluster 12	2747198 - 2785021	37824	<i>yogA, ppsAB</i> and 1 gene encoding another NRPS	Fengycin precursor	Yes
cluster13	2830530 - 2868265	37736	genes encoding 2 NRPS, 2 PKS/NRPS-like proteins, 1 Type 1 Trans-AT PKS-NRPS and 1 Hybrid PKS-NRPS	Un-determined	Yes
cluster14	2986246 - 3011656	25411	<i>srfAA, AB, AC, AD, Lpa</i> and 1 gene encoding a PKS/NRPS-like protein	Surfactin	Yes
cluster 15	3382575 - 3389632	7058	<i>spaCBKRT, 2 spaS, eriEI, srtF</i>	Ericin_A	No
cluster16	3562875 - 3589664	26790	<i>dltE, yjcK, besA, dhhABCEf</i>	Siderophore	Yes
cluster 17	4095112 - 4118071	22960	<i>dfnDEF</i> , genes encoding 2 Type I Trans-AT PKS	Un-determined	Yes

Discussion

In biological control, interest is often focused on few bacterial genera, such as *Bacillus* or *Pseudomonas*, which are the best-documented genera with fungal biocontrol activity in the literature (Weller, 1988). In our study, we are interested in two *B. amyloquefaciens* strains, JM3 and AB42 that are phylogenetically close to each other, but have different antifungal activities on *F. graminearum* *Fg1* in *in vitro* conditions. JM3 is able to strongly inhibit the spore germination of *Fg* (it belongs to class II of *Fg* inhibitors, see chapter VIII A), whereas AB42 is rather classified as a weak inhibitor of spore germination of *Fg* (it belongs to class V of *Fg* inhibitors, see chapter VIII A). However, inhibition of mycelial growth is similar between the two strains.

In order to understand the difference of activity in the spore germination of these two closely related *B. amyloquefaciens* strains, a comparative approach was chosen, both at the level of the metabolites produced by JM3 and AB42 in pure culture and of their genomes. Firstly, it was necessary to choose the metabolite extraction method. Following various tests, a liquid-liquid extraction using ethyl acetate was chosen, because it allowed to obtain the best diversity of compounds in the extracts (data not shown). We focused on the metabolites that were found in the bacterial culture supernatant. These metabolites can be produced by strains either from an endogenous bacterial production or from the catabolism of compounds of the starting culture medium.

Compounds present on the chromatograms obtained for JM3 and AB42 seem similar and seem to differ only in their relative quantity, in particular in the fractions F4 and F5 where the inhibition activity of *Fg* mycelial growth and spore germination was found in *in vitro* conditions. To determine whether the molecules of interest found in these fractions were not solely due to the metabolism of compounds present in the medium, different types of culture media were used and compounds extracted from the corresponding culture supernatants (data not shown). The preliminary results obtained seem to indicate that the molecules of interest are produced whatever the different media used (15 in total). These molecules are thus produced endogenously by JM3 and AB42.

Despite various attempts, we were not able to find other growth conditions in which the molecules of interest are more highly produced. Indeed, studies have already shown the importance of the culture medium in the production of biocontrol molecules by rhizobacteria, as is the case of 2,4-diacetylphloroglucinol in fluorescent *Pseudomonas* (Shanahan et al., 1992a). Interestingly, in our culture conditions which do not involve the presence of the pathogen, strain JM3 is capable of producing the antifungal molecule(s). This characteristic could suggest that the compounds of interest might have another role than a sole *Fg* growth inhibition function.

The 6 molecules studied, present in fraction F4 and F5, and involved in the inhibition of *Fg* seem to belong to the apocarotenoid family. The C107 and C115 molecules appear to be the basic molecules to which sugars are grafted to give compounds C95, C98, C103 and C105. In order to confirm this first hypothesis, an enzymatic digestion using a glycosylase would be necessary. If our hypothesis is correct, it could make it possible to increase the quantity of C107 and C115 molecules, and thus to be able to perform MNR on molecules allowing a more complete chemical identification of these molecules. In parallel, tests of *in vitro* activities would be carried out to characterize the biological effects of the purified molecules on *Fg*. It would be interesting to test the molecules of interest *in planta* in order to evaluate their ability to protect wheat against *Fusarium* diseases and to induce a systemic resistance. Indeed, in *Bacillus*, molecules such as fengycins and surfactins are known for their antimicrobial activity (Falardeau et al., 2013), but also to be elicitors of the ISR (Ongena et al., 2007). Both the JM3 and AB42 strains might be able to elicit ISR in wheat, as AntiSMASH prediction suggest they harbor the gene clusters involved in the biosynthesis of surfactin and fengycin (Table 5).

An apocarotenoid is a chemical compound that differs from a carotenoid by loss of a fragment at one or at the other extremity of the carbon chain. They are often derived from the oxidation of carotenoids by a family of enzymes called CDD (Carotenoid Cleavage Dioxigenase) (Walter et al., 2010). In plants, apocarotenoids play important roles, both in plant development and in the perception of stress (Hou et al., 2016). In bacteria, their role is less described in the literature but they are known to be involved in pigmentation, photoprotection, photosynthesis but also cell-to-cell communication (Sui et al., 2013) or as antioxidants by neutralizing free oxygen radicals (Vachali et al., 2012). Kim et al recently discovered a dozen of apocarotenoids synthesized in *E. coli* capable of scavenging free radicals (Kim et al., 2016). Some studies have shown the production of apocarotenoids in *Bacillus* that are involved in photoprotection (Khaneja et al., 2010; Perez-Fons et al., 2011).

There are few studies about the role and the production of apocarotenoids as antifungal compounds, except in the case of plant apocarotenoids (Sung et al., 2007). But this is the first time, to our knowledge, that apocarotenoids of *Bacillus* are shown as being potentially involved in the growth inhibition of a fungus *in vitro*. But, no mechanism of action can be yet advanced. In our study, it seems that the addition of a sugar on the core molecules enhances their antifungal activity, because the AB42 strain produces only a very few amount of molecules in a glycosylated form unlike JM3. This could explain the difference of activity we observed between the 2 strains. To confirm this hypothesis, a bioguided fractionation of AB42 culture supernatant and the evaluation of the activity of the different fractions would be firstly performed, and secondly we will try to purify the different molecules by finding optimal conditions for their production, and test them individually in order to evaluate their biological activity.

Conclusion

The 6 relevant molecules differently produced by JM3 and AB42 have to be purified to allow their chemical characterization and thus verify whether they are or not apocarotenoids. Once we are able to purify them, studies for evaluating their biological activities *in vitro* and *in planta* will be possible and will allow a better understanding of the role and functioning of these molecules. If the antifungal activity is validated, these works open the door to a new function for *Bacillus* apocarotenoids. In the search for new molecules active against pathogens of whether humans or plants, this advance could lead to new ways of treating diseases.

Ce qu'il faut retenir de la partie

- ♣ Cette partie a ciblé la capacité des souches à inhiber la germination des spores et la croissance mycélienne de *Fg*. La sélection des souches utilisées a été effectuée à partir des tests *in planta* de la partie précédente.
- ♣ L'utilisation des combinaisons de bactéries a permis de faire ressortir une souche très efficace *in vitro* : JM3.
- ♣ Les combinaisons semblent représenter un avenir en ce qui concerne le développement de biopesticides car l'accumulation de fonctions bénéfiques pour la plante au sein d'un consortium pourrait être la clé du succès d'un tel produit. Des essais *in planta* et au champ seront nécessaires pour confirmer les bénéfices apportés par des consortiums.
- ♣ Par une approche comparative, en particulier sur les profils métaboliques, entre deux souches génétiquement proches, JM3 et AB42, une fonction antifongique aurait été découverte pour des apo-caroténoïdes bactériens. Mais, les résultats seront à confirmer par approche RMN couplée à des tests d'activités.

References

- Achuo, E.A., Prinsen, E., Höfte, M., 2006. Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathol.* 55, 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>
- Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G., Phillips, D.A., Nelson, L.M., 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can. J. Microbiol.* 47, 916–924. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-10-916>
- Aktar, W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Avis, T.J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
- Bachate, S. p., Cavalca, L., Andreoni, V., 2009. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *J. Appl. Microbiol.* 107, 145–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04188.x>
- Bell, S., Alford, R., Garland, S., Padilla, G., Thomas, A., 2013. Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. *Dis. Aquat. Organ.* 103, 77–85. <https://doi.org/10.3354/dao02560>
- Ben Abdeljalil, N.O., Vallance, J., 2016. Bio-suppression of sclerotinia stem rot of tomato and biostimulation of plant growth using tomato-associated rhizobacteria. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 07. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000331>
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Carson, R., 2002. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Harcourt.
- Chagas, F.O., Pessotti, R. de C., Caraballo-Rodríguez, A.M., Pupo, M.T., 2017. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem. Soc. Rev.* <https://doi.org/10.1039/c7cs00343a>
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., Prakash, A., 2008. Volatiles as priming agents that initiate plant growth and defence responses. *Curr. Sci.* 94, 595–604.
- Conrath, U., 2009. Chapter 9 Priming of Induced Plant Defense Responses, in: *Advances in Botanical Research*, Advances in Botanical Research. Academic Press, pp. 361–395. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51009-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51009-9)
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., Kohler, A., 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 113–119. <https://doi.org/10.1023/A:1008768516313>
- Cooper, J., Dobson, H., 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot.* 26, 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.022>
- Dal Bello, G.M., Monaco, C.I., Simon, M.R., 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 627–636.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F., 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* 32, 1682–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
- D’mello, J.F., Macdonald, A.M., Postel, D., Dijkema, W.T., Dujardin, A., Placinta, C.M., 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 741–751.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843–7853.
- Fraire-Velázquez, S., Rodríguez-Guerra, R., Sánchez-Calderón, L., 2011. Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants, in: *Abiotic Stress Response in Plants-Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Renato de Freitas, J., Seib, A.M., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00020-8)
- Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5, 515–525. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x>
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux, J.-P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 16, 851–858. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.10.851>
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>
- Joly, P., Bonnemoy, F., Besse-Hoggan, P., Perrière, F., Crouzet, O., Cheviron, N., Mallet, C., 2015. Responses of Limagne “Clay/Organic Matter-Rich” Soil Microbial Communities to Realistic Formulated Herbicide Mixtures, Including S-Metolachlor, Mesotrione, and Nicosulfuron. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 413. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2683-0>
- Joshi, P., Bhatt, A.B., 2011. Diversity and function of plant growth promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalayan region. *Int J Env. Sci* 1, 1135–1143.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.006>
- Khan, M.R., Doohan, F.M., 2009. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. *Biol. Control* 48, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.015>
- Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J., Jensen, D.F., Gerhardson, B., Hökeberg, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L., Henriksen, B., 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 775–784.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Letunic, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Levitan, L., Merwin, I., Kovach, J., 1995. Assessing the relative environmental impacts of agricultural pesticides: the quest for a holistic method. *Agric. Ecosyst. Environ.* 55, 153–168. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(95\)00622-Y](https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)00622-Y)
- Mesterhazy, A., Bartok, T., Lamper, C., 2003. Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of *Fusarium* head blight. *Plant Dis.* 87, 1107–1115. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.9.1107>
- Milus, E.A., Parsons, C.E., 1994. Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* 78, 697–699.
- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W., 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett.* 566, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.011>

- Moussa, T.A.A., Almaghrabi, O.A., Abdel-Moneim, T.S., 2013. Biological control of the wheat root rot caused by *Fusarium graminearum* using some PGPR strains in Saudi Arabia: Biocontrol of wheat root-rot disease. *Ann. Appl. Biol.* 163, 72–81. <https://doi.org/10.1111/aab.12034>
- Nourozian, J., Etebarian, H.R., Khodakaramian, G., others, 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin J Sci Technol* 28, 29–38.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Palazzini, J.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2007. Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Prot.* 26, 1702–1710. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.004>
- Pan, D., Mionetto, A., Tiscornia, S., Bettucci, L., 2015. Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. *Mycotoxin Res.* 31, 137–143. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0224-8>
- Paulitz, T.C., Zhou, T., Rankin, L., 1992b. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* hydroponically grown cucumber. *Biol. Control* 2, 226–237. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(92\)90063-J](https://doi.org/10.1016/1049-9644(92)90063-J)
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics* 8, 17–29. <https://doi.org/10.1007/BF02286399>
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340, 505–520. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8>
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J. Plant Physiol.* 176, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>
- Sadfi, N., Chérif, M., Fliss, I., Boudabbous, A., Antoun, H., 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *J. Plant Pathol.* 83, 101–117.
- Sagar, S., Dwivedi, A., Yadav, S., Tripathi, M., Kaistha, S.D., 2012. Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* strain Cr11. *Chemosphere* 86, 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.031>
- Schisler, D.A., Khan, N.I., Boehm, M.J., Slininger, P.J., 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. *Plant Dis.* 86, 1350–1356.
- Shao, H., Zhang, Y., 2017. Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Sci. Rep.* 7, 5521. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>
- Shi, C., Yan, P., Li, J., Wu, H., Li, Q., Guan, S., 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 1094–1105. <https://doi.org/10.3390/ijerph110101094>
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Katinakis, P., 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 35–44. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000010132.91241.cb>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>

van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(96\)01096-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(96)01096-1)

Van Loon, L.C., Bakker, P., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483.

Verma, P., Yadav, A.N., Khannam, K.S., Kumar, S., Saxena, A.K., Suman, A., 2016. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *J. Basic Microbiol.* 56, 44–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500459>

Yin, C., Hulbert, S.H., Schroeder, K.L., Mavrodi, O., Mavrodi, D., Dhingra, A., Schillinger, W.F., Paulitz, T.C., 2013. Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7428–7438. <https://doi.org/10.1128/AEM.01610-13>

Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y.M.E., Liu, Y., 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* 9, e92486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>

Table S 2 - Fifty eight secondary metabolites differently produced by strains JM3 and AB42

Compound identification		Relative area (%) [§]	
Compound N°	Retention time (min)	JM3	AB42
C12	0.862	0 b	0.353 a
C17	1.058	0.967 b	1.275 a
C23	1.5	0.149 b	0.18 a
C24	1.562	0.154 b	0.176 a
C43	2.874	0.171 a	0.101 b
C45	2.967	0.038 a	0 b
C50	3.2	0 b	0.239 a
C54	3.462	0.269 a	0.248 b
C57	3.711	0.144 a	0.122 b
C61	3.964	0.716 b	0.784 a
C64	4.137	0.24 a	0.207 b
C65	4.33	0.048 b	0.416 a
C70	4.688	0.037 b	0.078 a
C72	4.855	0.028 b	0.072 a
C74	5.01	0.102 b	0.313 a
C75	5.102	0 b	0.25 a
C76	5.178	0.707 a	0.332 b
C77	5.246	0.228 b	0.318 a
C78	5.34	0.098 b	0.268 a
C79	5.417	0.379 a	0 b
C80	5.483	0.093 a	0 b
C81	5.528	0.127 a	0.015 b
C82	5.573	0.162 a	0.054 b
C83	5.604	0.146 a	0.083 b
C85	5.661	4.344 a	1.205 b
C86	5.687	0.566 a	0 b
C88	5.802	0.024 b	0.297 a
C90	5.876	1.784 a	0 b
C91	5.862	0 b	0.113 a
C92	5.903	0 b	0.182 a
C93	5.962	0.059 b	0.208 a
C94	5.999	0.072 a	0 b
C95	6.037	15.605 a	1.108 b
C98	6.091	9.442 a	0.879 b
C101	6.136	0.493 a	0.076 b
C102	6.159	0.326 a	0 b
C103	6.193	4.023 a	0.399 b
C105	6.23	3.482 a	0.636 b
C106	6.267	0.255 a	0 b
C107	6.304	0.288 b	2.288 a
C108	6.357	0.349 a	0.081 b
C111	6.444	16.943 b	28.525 a

C112	6.536	6.097 b	8.39 a
C113	6.575	0.609 b	3.613 a
C115	6.665	4.244 b	6.941 a
C117	6.745	1.855 b	3.879 a
C118	6.769	0.762 b	2.771 a
C120	6.838	0.125 b	0.56 a
C121	6.88	0.091 b	1.726 a
C123	6.959	0.126 a	0 b
C124	6.997	0 b	0.047 a
C128	7.141	3.411 b	6.351 a
C129	7.242	0 b	0.093 a
C130	7.311	0.05 b	0.106 a
C131	7.357	0.13 b	0.298 a
C132	7.415	0.1 b	0.219 a
C133	7.454	0.426 b	0.988 a
C139	7.876	0.02 b	0.05 a

[§]Compounds were detected by UPLC-Q-TOF at UV 280nm. Relative area were calculated by dividing the peak area of one compound to the sum of areas from all detected compounds. Different letters indicate difference of relative area between strain JM3 and AB42 on the chromatogram (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$).

Table S 3 - Genomic objects of JM3 and AB42

Genomic objects	AB42	JM3
Number of Genomic Objects (CDS, fCDS, rRNA, tRNA, miscRNA)	3996	4473
Number of CDS and fCDS	3834	4301
Number of misc_RNA	79	84
Number of rRNA (16s_rRNA/23s_rRNA/5s_rRNA)	3 (1/1/1)	4 (1/1/2)
Number of tmRNA	1	1
Number of tRNA	79	83

Table S 4 - Genes specific to JM3 and absent in AB42
(with >80% amino acids identity and 80% alignment coverage)

Label	Gene	Product
Transporter		
JM3_v1_50040	<i>bifL</i>	ABC transporter (ATP-binding protein) biofilm formation
JM3_v1_30263		ABC transporter ATP-binding protein
JM3_v1_50041		ABC transporter permease
JM3_v1_50026		ATP binding protein of ABC transporter
JM3_v1_30187	<i>atpI</i>	ATP synthase (subunit i)
JM3_v1_30057	<i>tagH</i>	ATP-binding teichoic acid precursor transporter component
JM3_v1_30460	<i>bcrA</i>	Bacitracin transport ATP-binding protein BcrA
JM3_v1_50042		Multidrug ABC transporter
JM3_v1_60261	<i>mdtP</i>	Multidrug-efflux transporter
JM3_v1_30462	<i>mrsE</i>	MrsE (Antibiotic transport system permease protein)
JM3_v1_30461	<i>mrsG</i>	MrsG (ABC-2 family transporter protein)
JM3_v1_40340		putative Glutamine ABC transporter ATP-binding protein
JM3_v1_50159	<i>nasA</i>	putative nitrate transporter
JM3_v1_50385	<i>ydeK</i>	putative permease
JM3_v1_20640		putative permease MDR type
JM3_v1_30560	<i>ycbK</i>	putative tryptophan or indole exporter
JM3_v1_70112	<i>mneS</i>	secondary Mn(II) exporter, promiscuous
JM3_v1_10005		Sodium:proton antiporter (fragment)
JM3_v1_10215	<i>yisU</i>	putative aminoacid related metabolite efflux transporter
JM3_v1_30264	<i>yhcl</i>	Antibiotic transport system permease protein
JM3_v1_60145	<i>spaT</i>	Subtilin transport ATP-binding protein SpaT
JM3_v1_60151	<i>srtF</i>	Lantibiotic transport ATP-binding protein SrtF
JM3_v1_60152	<i>eriE</i>	putative SpaE (transmembrane transport)
JM3_v1_60153		Lantibiotic protection ABC transporter permease
JM3_v1_50027		ABC transporter, permease protein
Factor		
JM3_v1_30110	<i>rtbE</i>	antitoxin factor of the RttD-RttE toxin-antitoxin system
JM3_v1_10912	<i>rttM</i>	antitoxin inhibiting Rnase RttL
JM3_v1_40555	<i>rttM</i>	antitoxin inhibiting Rnase RttL
JM3_v1_40239	<i>hupN</i>	HU-related DNA-binding protein; phage SPbeta
JM3_v1_20664	<i>ytjA</i>	membrane protein insertion efficiency factor
JM3_v1_60392	<i>comX</i>	competence pheromone precursor (pheromone peptide aa 46->55, geranyl-modified)
JM3_v1_40500	<i>yoyD</i>	putative exported protein
JM3_v1_30587	<i>yyzM</i>	putative nucleic acid binding protein
JM3_v1_40341	<i>yorV</i>	putative nucleic acid binding protein; phage SPbeta

JM3_v1_10513	<i>ykzQ</i>	putative peptidoglycan binding protein
JM3_v1_40248	<i>spbT</i>	toxin; phage SPbeta
JM3_v1_30416; JM3_v1_70032		DNA-binding protein

Regulator

JM3_v1_50329	<i>phrI</i>	ICEBs1 mobile element: secreted regulator of the activity of phosphatase RapI
JM3_v1_20216		MerR family transcriptional regulator
JM3_v1_30051	<i>lytB</i>	modifier of major autolysin amidase LytC
JM3_v1_20639	<i>nrsE</i>	NrsE (DNA binding transcription factor activity)
JM3_v1_50386		ydeL
JM3_v1_10216	<i>yisV</i>	putative PLP-dependent transcriptional regulator
JM3_v1_40475	<i>yosT</i>	putative transcription modulator; phage SPbeta
JM3_v1_40267; JM3_v1_40268	<i>yopB</i>	putative transcriptional regulator, lambda repressor-like; phage SPbeta
JM3_v1_40294	<i>yopS</i>	putative transcriptional regulator, lambda repressor-like; phage SPbeta
JM3_v1_40394	<i>yotL</i>	putative transcriptional regulator; phage SPbeta
JM3_v1_70021	<i>yqaF</i>	putative transcriptional regulator; skin element
JM3_v1_40451	<i>phrK</i>	secreted regulator of the activity of phosphatase RapK
	<i>sknR</i>	skin element; transcriptional repressor of yqaF-yqaN operon (Xre family)
JM3_v1_70020	<i>link</i>	two-component response regulator [LinJ] (linearmycin resistance, biofilm formation)
JM3_v1_50038		two-component response regulator [YrkQ]
JM3_v1_20224	<i>yrkP</i>	two-component sensor histidine kinase YvrG [cell wall processes and sublancin production and immunity (YvrG)]
JM3_v1_30459	<i>yvrH</i>	
JM3_v1_30407	<i>licT</i>	transcriptional antiterminator (BglG family)
JM3_v1_50340	<i>cdnL</i>	transcriptional regulator for repair and outgrowth of heat damaged spores
JM3_v1_60254	<i>yusT</i>	transcriptional regulator of unknown specificity (LysR family)
JM3_v1_10454		Transcriptional regulator YeiL (fragment)
JM3_v1_60154	<i>spaR</i>	Transcriptional regulatory protein SpaR
JM3_v1_40284	<i>aimR</i>	Arbitrium peptide sensor regulator; phage SPbeta

Receptor

JM3_v1_50037		Sensor histidine kinase
JM3_v1_60155	<i>spaK</i>	Sensor histidine kinase SpaK
JM3_v1_60393	<i>compP</i>	two-component sensor histidine kinase
JM3_v1_20223	<i>yrkQ</i>	two-component sensor histidine kinase [YrkP]
JM3_v1_30458	<i>mrsK</i>	MrsK2 (Sensor Histidine kinase)

Cellular process		
JM3_v1_40443	<i>ypqP</i>	YpqP (sporulation capsular polysaccharide biosynthesis enzyme C-terminal end)
JM3_v1_40467	<i>yodU</i>	YodU (spore capsular polysaccharide biosynthesis enzyme)
JM3_v1_70307	<i>sspK</i>	small acid-soluble spore protein
JM3_v1_70090		Abi family protein
JM3_v1_10512	<i>ykvP</i>	spore protein (HGT island)
JM3_v1_10891	<i>ymaG</i>	inner spore coat protein; cell wall associated protein
Enzymes		
JM3_v1_50164	<i>bglC</i>	aryl-phospho-beta-d-glucosidase
JM3_v1_50331		Aspartate phosphatase
JM3_v1_50156	<i>nasC</i>	
JM3_v1_50157	<i>nasB</i>	assimilatory nitrate reductase (catalytic subunit) assimilatory nitrate reductase (electron transfer subunit NasB)
JM3_v1_40459		ATP-dependent DNA ligase (fragment)
JM3_v1_30059	<i>tagF</i>	CDP-glycerol:polyglycerol phosphate glycerophosphotransferase (poly(glycerol phosphate) polymerase)
JM3_v1_30428	<i>wapA</i>	cell wall-associated tRNA nuclease precursor; intercellular growth inhibitor
JM3_v1_10994		Choline esterase
JM3_v1_40375	<i>folA</i>	Dihydrofolate reductase
JM3_v1_20429	<i>hsdM</i>	DNA methylase M
JM3_v1_40335		DNA polymerase
JM3_v1_20304; JM3_v1_70045		Dutpase
JM3_v1_30066	<i>lytD</i>	exported N-acetylglucosaminidase (major autolysin) (CWBP90)
JM3_v1_10225	<i>cypC</i>	fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450
JM3_v1_30350	<i>relQ</i>	fragment of (p)ppGpp synthetase (part 1)
JM3_v1_10678	<i>thiQ</i>	fragment of N-formyl-4-amino-5-aminomethyl-2-methylpyrimidine deformylase (part 2)
JM3_v1_50261	<i>nudT</i>	fragment of putative NTP pyrophosphohydrolase (part 1)
JM3_v1_60311; JM3_v1_60312	<i>yqbD</i>	fragment of putative nucleic acid-binding protein; skin element
JM3_v1_30060; JM3_v1_30061	<i>tagE</i>	fragment of UDP-glucose:polyglycerol phosphate alpha-glucosyltransferase
JM3_v1_30325	<i>galk</i>	Galactokinase
JM3_v1_40450		GCN5-like N-acetyltransferase
JM3_v1_40215		Glycerophosphodiester phosphodiesterase
JM3_v1_70117		GNAT family acetyltransferase

JM3_v1_20209		GNAT family N-acetyltransferase (fragment)
JM3_v1_50044		Gramicidin dehydrogenase
JM3_v1_30001		Gramicidin S synthase 2 (fragment)
JM3_v1_10330		Hit (histidine triad motif)-like protein involved in cell-cycle regulation
JM3_v1_60256	<i>yusQ</i>	hydratase of unknown specificity (tautomerase superfamily)
JM3_v1_50373	<i>thiD</i>	Hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine kinase
JM3_v1_50328	<i>rapI</i>	ICEBs1 mobile element: response regulator aspartate phosphatase
JM3_v1_60391	<i>comQ</i>	isoprenyl transferase (pre-ComX modification) lesion bypass phage DNA polymerase; phage SPbeta
JM3_v1_40194	<i>uvrX</i>	Malonyl-CoA transacylase
JM3_v1_50047		Methyltransferase
JM3_v1_60286		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
JM3_v1_20275	<i>lytG</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
JM3_v1_40201		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (major autolysin)
JM3_v1_30050	<i>lytC</i>	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase (fragment)
JM3_v1_10511		NADPH-dependent FMN reductase
JM3_v1_60428		Non-ribosomal peptide synthetase PstA (fragment)
JM3_v1_60001		Oligoribonuclease NrnB
JM3_v1_40328	<i>nrnB</i>	Peptidase G2
JM3_v1_70281		Peptidase U35
JM3_v1_20288		Peptide synthetase
JM3_v1_50045;JM3_v1_50046		
JM3_v1_50185	<i>bsdD</i>	phenolic acid decarboxylase subunit
JM3_v1_20215	<i>pgoN</i>	promiscuous glyoxal/methylglyoxal reductase
JM3_v1_30567	<i>yyaT</i>	putative acetyltransferase (polyamine degradation)
JM3_v1_70031	<i>yqaK</i>	putative DNA recombination protein; skin element
JM3_v1_50363	<i>yrkC</i>	putative enzyme; cupin family
JM3_v1_40212	<i>yomM</i>	putative integrase; phage SPbeta
JM3_v1_40382	<i>yotB</i>	putative metallo-dependent hydrolase; phage SPbeta
JM3_v1_20228	<i>yrkN</i>	putative N-acetyltransferase
JM3_v1_70030	<i>yqaJ</i>	putative nuclease; skin element
JM3_v1_40338	<i>yorR</i>	putative nucleotide kinase or triphosphate hydrolase; phage SPbeta
JM3_v1_10983	<i>yjmD</i>	putative oxidoreductase
JM3_v1_70017	<i>yqaB</i>	putative peptidase; skin element
JM3_v1_40219	<i>yomS</i>	putative phage-related lytic exoenzyme; phage SPbeta

JM3_v1_20213	<i>ygeA</i>	putative racemase
JM3_v1_60339	<i>yjcK</i>	putative ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase
JM3_v1_40290	<i>yopP</i>	putative SPBc2 prophage-derived integrase/recombinase, phage integrase, phage SPbeta
JM3_v1_10514		putative sporulation-specific glycosylase
JM3_v1_40318	<i>yoqW</i>	putative stress-associated peptidase; putative general secretion pathway protein; phage SPbeta
JM3_v1_40323	<i>yorA</i>	putative uronase; phage SPbeta
JM3_v1_40184		Recombinase
JM3_v1_40332		Replicative DNA helicase
JM3_v1_20426; JM3_v1_20427		Resolvase domain (fragment)
JM3_v1_40452	<i>rapK</i>	response regulator aspartate phosphatase
JM3_v1_50269	<i>rapH</i>	Response regulator aspartate phosphatase H
JM3_v1_40196	<i>rapI</i>	Response regulator aspartate phosphatase I
JM3_v1_10322		Ribonuclease YobL (fragment)
JM3_v1_50372; JM3_v1_50408		SAM-dependent methyltransferase
JM3_v1_20290; JM3_v1_20291		Terminase
JM3_v1_60005		Thioesterase
JM3_v1_50371		Thymidylate synthase
JM3_v1_40374	<i>thyA</i>	thymidylate synthase A (phage origin)
JM3_v1_60255; JM3_v1_30004		3-ketoacyl-ACP reductase (or fragment)
JM3_v1_50353		Cupin
JM3_v1_20430		Type I restriction enzyme, R subunit
JM3_v1_40265		Acetyltransferase
JM3_v1_50374		Uncharacterized 45.4 kDa protein in thiaminase I 5' region
JM3_v1_70016	<i>Int</i>	DNA integration/recombination/inversion protein
JM3_v1_30005		Carbonyl reductase (NADPH) (fragment)

Extra-chromosomal origin

JM3_v1_70089	<i>blyA</i>	bacteriophage SPbeta N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
JM3_v1_40317	<i>yoqV</i>	DNA ligase-like protein; bacteriophage SPbeta
JM3_v1_40322	<i>pghZ</i>	gamma-polyglutamate hydrolase; phage SPbeta
JM3_v1_40208	<i>cwlP</i>	lytic transglycosylase; SPbeta phage protein
JM3_v1_70070		Phage gp6-like head-tail connector protein
JM3_v1_20283		Phage head-tail adapter protein
JM3_v1_40199		Phage holing

JM3_v1_70074		Phage major tail protein
JM3_v1_70088	<i>xhIB</i>	phage PBSX; holin
JM3_v1_10376	<i>xpdC</i>	phage PBSX; manganese-containing peroxidase
JM3_v1_20212		Phage portal protein
JM3_v1_70022		Phage protein
JM3_v1_70060		Phage related protein
JM3_v1_20280		Phage tail protein
JM3_v1_20276		Phage tail protein
JM3_v1_20214		Phage-like element PBSX protein
JM3_v1_20289		Phage portal protein
JM3_v1_40206	<i>yomG</i>	putative DNA wielding protein; SPbeta phage
JM3_v1_10857; JM3_v1_10858		Putative phage integrase (fragment)
JM3_v1_10356	<i>yjzl</i>	putative phage protein
JM3_v1_40186	<i>ynaB</i>	putative phage protein; defective phage region
JM3_v1_40446	<i>ynaB</i>	putative phage protein; defective phage region
JM3_v1_10909	<i>ynzG</i>	putative phage protein; defective phage region
JM3_v1_50028	<i>ybdN</i>	putative phage protein; prophage region 1
JM3_v1_50029	<i>ybdO</i>	putative phage protein; prophage region 1
JM3_v1_40393		putative nucleic acid binding protein; phage SPbeta (fragment)
JM3_v1_20277		putative phage tail tape measure protein TMP
JM3_v1_20274; JM3_v1_40202	<i>yobO</i>	putative phage-related pre-neck appendage protein; defective prophage 6
JM3_v1_20284		putative Uncharacterized phage protein (DNA packaging)
JM3_v1_40466	<i>sprB</i>	recombination directionality factor; phage SPbeta
JM3_v1_40444	<i>sprA</i>	serine-type phage integrase; phage SPbeta
JM3_v1_40362	<i>nrdIB</i>	SPbeta phage subunit of ribonucleoside diphosphate reductase
JM3_v1_40367	<i>yosR</i>	SPBc2 prophage-derived thioredoxin-like protein YosR
JM3_v1_40185	<i>nukF</i>	calcium-dependent DNA nuclease, lipoprotein; phage SPbeta

Lipoprotein

JM3_v1_30052	<i>lytA</i>	membrane bound lipoprotein
JM3_v1_60150	<i>eril</i>	putative Spal (signal) Producer-immunity system

Structure

JM3_v1_20123	<i>rpmGA</i>	ribosomal protein L33
JM3_v1_70216		G5 domain-containing protein (fragment)
JM3_v1_30024	<i>Hag</i>	flagellin protein

Biosynthesis of Secondary metabolites		
JM3_v1_60147;JM3_v1_60149	<i>spaS</i>	Lantibiotic subtilin
JM3_v1_60144	<i>spaB</i>	Subtilin biosynthesis protein SpaB
JM3_v1_60146	<i>spaC</i>	Subtilin biosynthesis protein SpaC
JM3_v1_30002		Amino acid adenylation domain-containing protein (NRPS)
Membrane component		
JM3_v1_50043		Membrane protein
JM3_v1_20008		Membrane protein (fragment)
JM3_v1_10178		MepB family protein
JM3_v1_20226	<i>yrkO</i>	putative integral inner membrane protein
JM3_v1_40454; JM3_v1_40311	<i>yoqO</i>	putative membrane protein; phage SPbeta
JM3_v1_20222	<i>psiE</i>	phosphate starvation inducible protein
Proteins of unknown functions, hypothetical proteins		542

Partie 3

Etude de la mise en place de l'ISR chez le blé à l'aide de la bactérie
modèle *Pseudomonas kilonensis* F113

Chapitre 10 – L’interaction blé – *Fg* – F113 du point de vue de l’induction d’une résistance systémique

Introduction

Face à un organisme pathogène, les plantes arborent des défenses constitutives telles les parois cellulaires, la cuticule, des substances antibiotiques préformées (par exemple des poches d’huile essentielle ou des tannins) ou une forte acidité. Elles peuvent aussi induire l’expression de gènes de défense. Cette induction peut être localisée au site d’infection. On parle alors d’acquisition de résistance locale (LAR pour *Local Acquired Resistance*) ou systémique, dans des zones de la plante éloignées du site de stimulation initial. Il existe de deux types de résistance systémique (c’est-à-dire généralisée à la plante entière), la SAR (pour *Systemic Acquired Resistance*) (Durrant and Dong, 2004; Métraux et al., 2002) et l’ISR (pour *Induced Systemic Resistance*) (Bakker et al., 2007; Iavicoli et al., 2003; Pieterse and van Loon, 1999). La SAR est une résistance développée par les plantes à la suite d’une première interaction avec un pathogène, et qui permet une meilleure résistance de la plante lors d’une infection ultérieure par cet organisme mais aussi par d’autres. L’ISR est induite par des micro-organismes non-pathogènes et consiste à l’élévation chez la plante d’une réponse lui permettant une meilleure capacité à mobiliser ses mécanismes de défense inductibles face à une confrontation ultérieure avec un organisme pathogène, que cela soit par un phénomène de "priming", pour lequel on ne note pas d’expression des gènes de défense tant qu’il n’y a pas d’attaque par un pathogène (Bakker et al., 2007; Pieterse et al., 2014), ou par un phénomène induisant l’expression de certains gènes de défense sans qu’il n’y ait développement de symptômes visuels chez la plante (Okubara et al., 2010). Ces réponses systémiques exercent un rôle de sentinelle permettant une réponse de défense plus rapide et plus forte de la plante à l’attaque ultérieure d’un pathogène.

Les effets « priming » conduisant à l’ISR ne sont pas toujours simples à étudier avec des systèmes classiques car ils n’induisent pas chez la plante de bouleversements profonds. De plus, avec les méthodes de culture traditionnelles, il est difficile de séparer les effets locaux des effets systémiques, aussi bien pour la plante que pour la bactérie d’intérêt. Pour répondre à cette problématique, il a été mis au point un système split-root, permettant de diviser le système racinaire en deux parties. Cet outil, non destructeur dans le cas des plantes monocotylédones, nous a permis d’explorer les capacités de phytoprotection du blé par *Pseudomonas kilonensis* F113 lors d’une infection par *Fusarium graminearum*. Il a aussi été étudié l’implication d’une molécule antimicrobienne, le DAPG (2-4 DiAcétylPhloroGlucinol), produit par F113, dans cette phytoprotection. Le DAPG a fait l’objet de

nombreuses études et se révèle être une molécule multifonctionnelle (Cronin et al., 1997; Jousset and Bonkowski, 2010; Lanteigne et al., 2012; Velusamy et al., 2006), et semble même être impliquée dans la mise en place de l'ISR chez *Arabidopsis thaliana* (Iavicoli et al., 2003). Nous avons voulu donc explorer l'action de cette molécule multifacette au sein du système tripartite blé-*Fg*-F113.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu caractériser la réponse moléculaire du blé et du pathogène lors de cette interaction tripartite, afin de mieux comprendre les mécanismes pouvant aboutir à une phytoprotection. Dans une dernière expérience, nous avons testé l'hypothèse d'une possible communication racine-racine permettant une induction d'une résistance systémique après élicitation par F113, à l'aide d'un dispositif de triple-split-root. Toutes ces expériences visent à mieux comprendre l'interaction tripartite blé-*Fg*-F113 et les répercussions qui peuvent en découler dans le sol. Le choix d'utiliser F113 dans ces expériences provient d'un commencement de ses travaux ultérieurement au début de la thèse, ainsi que la mise à disposition d'outils génétiques sur cette souche permettant d'investiguer le rôle du DAPG dans l'induction d'une résistance systémique au-delà de son effet antimicrobien.

Matériel et Méthodes

Effet de phytoprotection de *Pseudomonas kilonensis* F113 via des effets antagonistes et d'induction de résistance systémique et implication du DAPG

Culture des souches de *F. graminearum* et de *Pseudomonas*

F. graminearum *Fg1* est cultivé, pendant 6 à 9 jours, à température ambiante, sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Conda) en déposant, au centre de la boîte de Petri, un disque d'agar (de 6 mm de diamètre) contenant l'inoculum fongique. Les souches bactériennes *Pseudomonas protegens* CHA0 (Iavicoli et al., 2003) et *P. kilonensis* F113 (Shanahan et al., 1992b) ainsi que le mutant DAPG⁻ F113G22 (F113 *phlD::kan*, (Shanahan et al., 1992b)) sont cultivés sur milieu gélosé King's B (Conda) ou dans du milieu King's B liquide sous agitation (140rpm), à 28°C, pendant 24h pour les tests d'inhibition, ou 36h pour les inoculations sur plante.

Production des spores de *F. graminearum*

Une préculture de *F. graminearum* est effectuée dans un erlenmeyer de 250mL contenant 50mL de milieu liquide MBB (*Mung Bean Broth*) auxquels sont ajoutés 10 disques mycéliens de 6mm de diamètre de *F. graminearum* (cultivé sur milieu PDA depuis 6 à 9 jours). L'incubation est réalisée sous agitation (180rpm) à température ambiante pendant 5 à 6 jours. Pour la culture, 5mL de préculture sont prélevés puis ajoutés à 45mL de milieu MBB (dans un erlenmeyer de 250ml). La culture est

incubée à température ambiante, sous agitation (180rpm), pendant 6 à 12 jours. Les spores sont obtenues suite à la filtration de la culture à l'aide d'un filtre stérile de type Myracloth (VWR) (20x20cm), après avoir préalablement agité fortement les erlenmeyers avant de verser leur contenu sur le filtre (afin de libérer les spores qui pourraient être contenues dans le mycélium). Le filtrat est réparti dans des tubes Falcon de 50mL, afin d'être centrifugé une première fois à 4700rpm pendant 5min. Le surnageant est éliminé délicatement, et le culot contenant les spores est repris dans 5mL d'eau stérile. Une deuxième centrifugation est effectuée, dans les mêmes conditions. Le surnageant est éliminé. Le culot de spores contenu dans un tube Falcon est repris dans 25mL d'eau stérile. Cette suspension est ensuite utilisée pour reprendre les culots de spores contenus dans les autres tubes (permettant ainsi de concentrer la suspension de spores). La titration de la suspension de spores est effectuée à l'aide d'une cellule de Thomas.

Développement d'un système 'split-root' de culture du blé en conditions non-stériles

Des pots (de hauteur 12cm) ont été fabriqués à partir de tubes carrés en PVC (35 x 35mm, longueur 25m) de la marque Alfer. Des bouchons en PVC (35 x 35mm), percés de 3 trous, ont été apposés à une extrémité des pots. Les pots ont été associés deux par deux, à l'aide de ruban adhésif. Dans le reste de cet article, un pot ainsi constitué de 2 compartiments est désigné sous le terme de pot 'split-root'. La décontamination des pots et leur stérilisation sont effectuées par trempage dans une solution de Javel à 1.9% (m/m) de chlore actif, pendant 2h et par un traitement aux ultraviolets (20min), respectivement.

Des graines pré-germées de blé (cultivar Récital) sont déposées dans du terreau de semis (Favorit®) et mises à germer dans une chambre climatique, avec un cycle jour/nuit de 16h/8h à une température respectivement de 20°C et 18°C. Quand les plantules ont atteint une hauteur d'environ 3-4cm, elles ont été délicatement prélevées, en veillant à ne pas endommager leurs racines. Le système racinaire est alors réparti, de façon égale, dans chacun des 2 compartiments d'un pot 'split-root', préalablement remplis au 4/5^{ème} avec du terreau de semis. Un complément de terreau est ensuite apporté (la masse finale de terreau par pot est comprise entre 80 et 120g) puis les plantules sont arrosées avec 15mL d'eau dans chaque compartiment. Les blés sont incubés dans une chambre climatique, dans des conditions identiques à celles précédemment citées. Un arrosage (10mL d'eau /pot) est effectué quotidiennement. Un apport d'engrais chimique (Nature&Progress) de 10mL, en respectant les recommandations du fabricant, a été effectué une fois par semaine, en remplacement de l'arrosage.

Après 4 jours d'incubation, les premières inoculations de microorganismes ont été réalisées. Les traitements sont : i) un témoin négatif (*i.e.* témoin plante), où aucun des micro-organismes n'a été

inoculé, ii) un témoin positif (*i.e.* témoin pathogène) où le champignon *F. graminearum* a été introduit à proximité des racines dans un compartiment du système, iii) un traitement 'ISR' où *P. kilonensis* F113 ou son mutant F113G22 est introduit dans un 1^{er} compartiment, 3 jours avant l'introduction de *F. graminearum* dans le 2^{ème} compartiment, iv) un traitement 'antagonisme' où F113 (ou son mutant F113G22) et *F. graminearum* sont introduits simultanément dans le même compartiment.

Neuf réplicats ont été effectués pour chacun des 7 traitements (témoin plante, témoin pathogène, ISR F113 'sans priming', ISR F113, ISR F113G22, antagonisme F113 et antagonisme F113G22) et ont été disposés en bloc (Figure 1) aléatoire complet.

Par compartiment, les racines sont inoculées avec $5 \cdot 10^8$ Unités Formant Colonies (UFC) de F113 (ou F113G22) et $2 \cdot 10^5$ spores de *F. graminearum*.

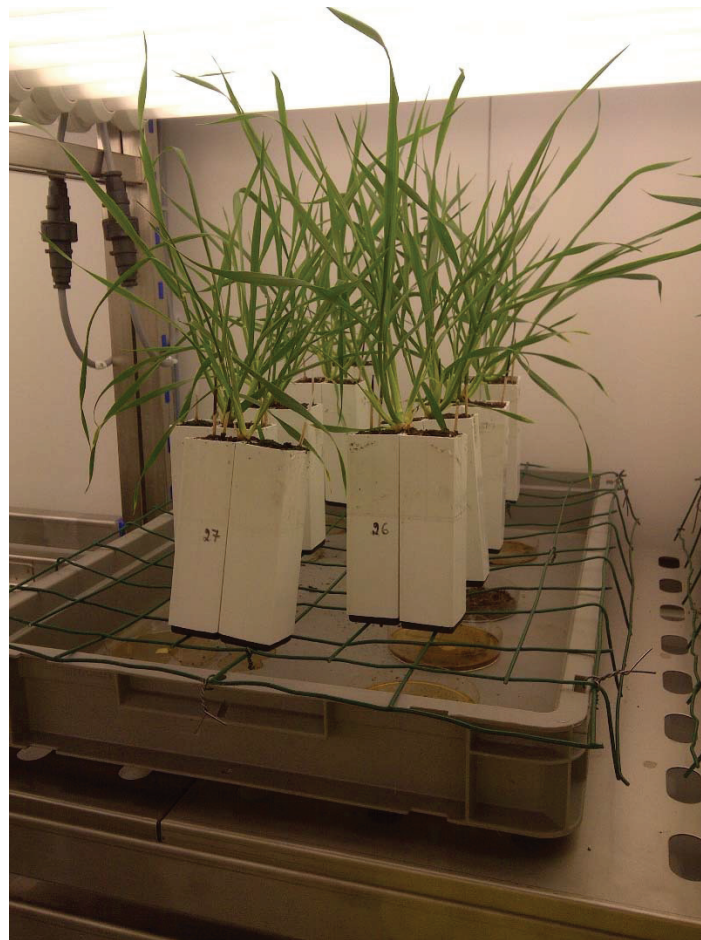


Figure 1 - Dispositif expérimental : représentation d'un bloc de traitement

Au bout de 30 jours de culture, les symptômes sont évalués à l'aide d'une grille (Tableau 1) et les racines présentes dans chaque compartiment des pots 'split-roots' ainsi que le collet sont prélevés. Les racines ont été secouées vigoureusement afin d'éliminer le sol adhérent. Les échantillons de racines ont ensuite été lyophilisés pendant 24 à 36h. Après lyophilisation, les racines ont été de nouveau secouées pour ne garder que le sol intimement lié à ces dernières. Tous les échantillons (sol

et collet) ont été broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon. Tous les instruments utilisés lors de cet échantillonnage (scalpels, pilons) ont été nettoyés à l'alcool entre chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C.

Tableau 1 - Evaluation de l'intensité des nécroses

Note	Intensité des nécroses
0	Aucune nécrose
1	1 nécrose < 1 cm
2	1 cm < 1 nécrose < 2 cm
3	1 nécrose > 2 cm
4	2 nécroses < 1 cm
5	1 cm < 2 nécroses < 2 cm
6	2 nécroses > 2 cm
7	3 nécroses < 1 cm
8	1 cm < 3 nécroses < 2 cm
9	3 nécroses > 2 cm
10	4 nécroses et + < 1 cm
11	1 cm < 4 nécroses et + < 2 cm
12	4 nécroses et + > 2 cm

Extraction et quantification d'ADN à partir des racines et du sol adhérent ou des collets

L'ADN a été extrait à partir de 100mg de matière sèche de racines et de sol adhérent aux racines ou de tissus végétaux (collet) à l'aide du kit 'FastDNA Spin Kit for Soil' (MP Biomedicals, OH, USA) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADN ont été élués dans 60µL d'eau stérile, et stockés à -20°C.

La quantification des ADN a été réalisée à l'aide du kit Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent (Molecular Probes, OR, USA) en suivant les recommandations du fournisseur. Le picogreen est un colorant qui émet une fluorescence à $\lambda_{em}=535nm$ lorsque qu'il est lié à l'ADN et excité à $\lambda_{ex}=485nm$. Une gamme étalon (allant de 6,25pg/µL à 0.2ng/µL d'ADN) a été réalisée avec un standard d'ADN à 100µg/mL fourni dans le kit. La lecture de la fluorescence a été réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre Infinite® 200 Pro (TECAN, Suisse).

Mise au point de la qPCR

Les quantifications des populations de *P. kilonensis* F113 (ou de son mutant F113G22) et de *F. graminearum* ont été réalisées par qPCR sur un LightCycler 480 (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA). Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 20µL contenant : 10µL de SYBR Green I Master mix (Roche Applied Sciences), 1 µL de chacune des deux amorces (à une concentration de

10nM), 6 µL d'H₂O et 2 µL d'ADN à une concentration de 2,5ng/µL. Les amorces (table 2) pour la quantification de *P. fluorescens* F113 ou de son mutant F113GG22 ont été décrites par Von Felten et collaborateurs (Von Felten et al., 2010), et les amorces (tableau 2) pour *Fg* nous ont été fournies par l'UMR INRA GDEC de Clermont-Ferrand et ciblent la région intergénique (IGS) 18S-28S de *F. graminearum*. Le programme de qPCR suivant (identique pour les deux paires d'amorces) a été utilisé : une première étape d'activation de 10min à 95°C, suivie d'une étape d'amplification composée de 40 cycles de 15s de dénaturation à 95°C, suivie de 30s d'hybridation à 60°C, puis de 30s d'élongation à 72°C. La courbe de fusion a été obtenue en dénaturant progressivement les produits amplifiés par incrémentation de la température de 0.11°C/s jusqu'à 98°C.

Les données ont été collectées à l'aide du logiciel du LightCycler 480. La gamme étalon pour la quantification de la souche F113 a été préparée à partir d'un échantillon d'ADN génomique à 0,5.10⁷ copies/µL, et dilué en série de manière décimale jusqu'à 0,5.10² copies/µL. Pour la quantification de *F. graminearum*, la gamme étalon a été préparée à partir d'un échantillon d'ADN d'IGS 18S-28S amplifié et validé par séquençage à 0,5.10⁹ copies/µL, et dilué en série de manière décimale jusqu'à 0,5.10² copies/µL. Six traitements (témoin plante, témoin pathogène, ISR F113, ISR F113G22, antagonisme F113, antagonisme F113G22) ont été analysées (5 répétitions/traitement).

Tableau 2 - Amorces utilisées pour le suivi des populations de F113 et de *Fg*

Micro-organisme	Nom des amorces	Séquence (5'-3')	T°C d'hybridation	Taille du fragment (pb)	Références
<i>P. fluorescens</i> F113	F113_1_for F113_1_rev	CAAGAAAGGTGAGCCGAGAC CGACAACCAGCACTTGAGAA	60	108	(Von Felten, 2010)
<i>F. graminearum</i>	<i>Fg</i> IGS_for <i>Fg</i> IGS_rev	GTTGATGGGTAAAAGTGTG CTCTCATATACCCTCCG	60	467	Communication personnelle

Etude de l'implication des gènes de défense dans la phytoprotection du blé par F113

Mise en place du dispositif expérimental

Sans germination préalable, 3 graines ont été déposées dans un pot, préalablement rempli avec du terreau (Favorit®), avant d'être inoculées ou non par la souche *P. kilonensis* F113 et ou le pathogène *Fg*. Les traitements sont les suivants : i) un témoin négatif (*i.e* témoin plante) ne contenant ni bactérie, ni champignon, ii) un témoin positif (*i.e* témoin pathogène) contenant uniquement *F. graminearum*, iii) un témoin bactérie, ne contenant que F113, et iv) un traitement où F113 et *Fg* sont co-inoculés. Pour chaque traitement, des plantes sont prélevées à 4 temps différents : 4jpi (*jour post-infection*),

7jpi, 9jpi, et 14jpi. Pour chaque temps, 3 réplicats par traitement sont réalisés. Pour chaque pot concerné, les graines sont inoculées avec 100µL d'une suspension à 10^7 UFC.mL⁻¹ de F113 et par 100µL d'une suspension à 10^4 spores.mL⁻¹ de *F. graminearum*. L'infection par *Fg* intervient 3 jours après l'inoculation de la bactérie. Pour les 3 premiers temps de prélèvements (4jpi, 7jpi et 9jpi), les parties aériennes des 3 plantes par pot ont été rassemblées. Pour le dernier temps de prélèvement (14jpi), le collet (sur une zone de 3cm de longueur) est prélevé pour chaque plante d'un pot. Dès que le prélèvement est effectué, les plantes ont été conservées dans l'azote liquide.

Extraction des ARN et obtention des ADNc

L'ARN a été extrait à partir de ces différents prélèvements à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Plant (RNA isolation from plant) (Ref 740949.50 ,Macherey Nagel, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN ont été élués dans 60 µL d'eau stérile. A partir de ces échantillons, les ADN potentiellement restants ont été éliminés à l'aide d'un kit TURBO DNA-free™ (Thermo Fischer Scientifique), en suivant les recommandations du fournisseur. Pour chaque tube, 50µL de surnageant, contenant les ARN, ont été prélevés et conservés à - 20°C. Pour vérifier que les ARN ne contenaient pas d'ADN, une PCR 18S a été effectuée sur les échantillons (Primer forward : CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT and reverse : CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC).

Pour obtenir des ADNc à partir des ARNs, le kit SuperScript®III First-Strand Synthesis System for RT_PCR (Thermo Fischer Scientifique) a été utilisé en choisissant des amorces aléatoires (mélange d'hexanucléotides). Pour la dénaturation, 8 µL d'ARN (1ng/µL) ont été utilisés, 1µL de mélange d'hexanucléotides (50 ng/µL) et 1µL de mélange de dNTP à 10 mM. Le mélange réactionnel contenait par échantillon : 2 µL de 10× RT Buffer, 4 µL de MgCl₂ à 25 mM, 2 µL DTT à 0,1 M, 1 µL de RNase OUT™ (40 U/µL) et 1 µL de SuperScript^R III RT (200 U/µL). Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C.

Quantification des gènes de défense du blé

La quantification des gènes de défense a été réalisée par qPCR sur un LightCycler 480 (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA). Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 20µL contenant : 10µL de SYBR Green I Master mix (Roche Applied Sciences), 1 µL de chacune des deux amorces (à une concentration de 10nM), 6 µL d'eau et 2 µL d'ADNc. Les amorces (tableau 3) ont été fournies par l'équipe de T. Langin du GDEC de l'INRA de Clermont-Ferrand.

Tableau 3 - Listes des amorces utilisés pour l'étude des gènes de défense

Gène	Amorces	Sequence amorce	Longueur d'amplicon (en pb)	Reference
PAL-2	PAL Fwd-2	GGTTCATGGCAACGAACACCTTGT	100	Beccarri et al., 2011
	PAL Rev-2	AGGAGCTTGGAACGGAGTACTTGA		
PR-2	PR2 Fwd	CTCGACATCGGTAACGACCAG	500	Desmond et al 2005
	PR2 Rev	GCGGCGATGTACTIONTGTGTTCC		
PR-10	PR10 Fwd	TTAAACCAGCACGAGAAACATCAG	150	Desmond et al 2005
	PR10 Rev	ATCCTCCCTCGATTATTCTCACG		
PR-4	PR4 Fwd	CGAGGATCGTGGACCAGTG	900	Beccari et al 2011
	PR4 Rev	GTCGACGAACTGGTAGTTGACG		
PR-5	PR5 Fwd-2	ACAGCTACGCCAAGGACGAC	450	Desmond et al 2005
	PR5 Rev-2	CGCGTCTAATCTAAGGGCAG		

Le programme de qPCR suivant (identique pour toutes les amorces) a été utilisé : une première étape d'activation de 10min à 95°C, suivie d'une étape d'amplification composée de 45 cycles de 15s de dénaturation à 94°C, suivie de 10s d'hybridation à 60°C, puis de 20s d'élongation à 72°C. La courbe de fusion a été obtenue en dénaturant progressivement les produits amplifiés par incrémentation de la température de 0.11°C/s jusqu'à 97°C. Les résultats sont exprimés en calculant le rapport d'induction en suivant les formules suivantes :

$$\Delta Ct_{\text{gène X}} = Ct_{\text{gène X de défense}} - Ct_{\text{gène 18S}}$$

$$\Delta \Delta Ct_{\text{gène X}} = \Delta Ct_{\text{gène X/traitement microbien}} - \Delta Ct_{\text{gène de défense / plante non-inoculée}}$$

$$\text{Rapport d'induction}_{\text{gène X}} = 2^{-\Delta \Delta Ct_{\text{gène X}}}$$

Pour chaque temps, trois réplicats biologiques ont été réalisés. Les résultats de facteurs d'induction sont exprimés sous la forme de moyenne \pm erreur standard.

Exploration du potentiel de communication entre racine de blé

Pour cette expérience, 4 pots cubiques (12x12x12cm) ont été agrafés ensemble, les uns à la suite des autres. Comme précédemment, les graines ont été mises à germer dans du terreau (Favorit®) pendant 4-5 jours avant de pouvoir les récupérer afin de diviser le système racinaire en deux parties égales. Dans chaque réplicat, 3 plantes (notées A, B, C sur la Figure 2) ont été disposées, comme précédemment décrit, dans les pots pour 'split-root'. Pour chaque traitement, 5 réplicats biologiques ont été effectués (Figure 3).

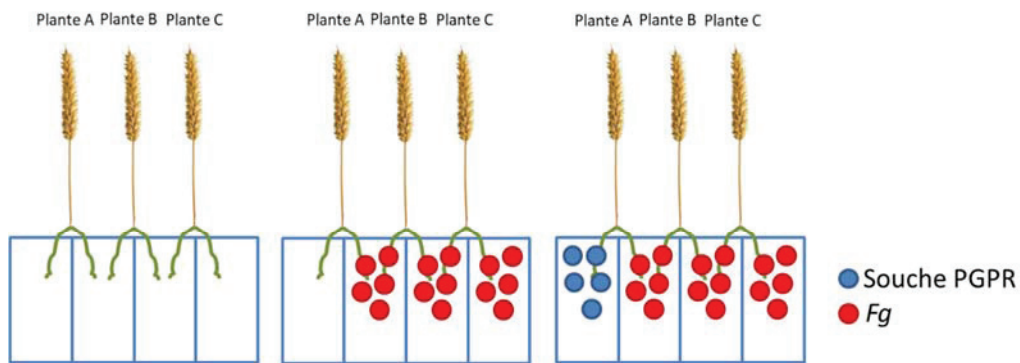


Figure 2 - Schéma du dispositif expérimental.

Les rectangles bleus représentent les pots, les ronds rouges représentent *Fg* et les ronds bleus représentent F113.



Figure 3 - Dispositif expérimental au bout de 2 semaines de culture

Après 4 jours d'incubation, la souche F113 est inoculée. Les traitements sont: i) un témoin négatif (*i.e.* témoin plante sans inoculation microbienne), ii) un témoin positif (*i.e.* témoin pathogène), où *Fg* est inoculé dans les pots 2, 3 et 4, et iii) une condition ISR, où la souche F113 est inoculée dans le 1^{er} pot tandis que *Fg* est inoculé dans les 3 pots suivants. L'inoculation de *Fg* a lieu 3 jours après celle de la souche F113. Pour chaque réplicat concerné, les plantes sont inoculées au niveau des racines avec 100µL d'une suspension à 10^7 UFC.mL⁻¹ de F113 et par 100µL d'une suspension de 10^4 spores.mL⁻¹ de *Fg*. Après 3 semaines de culture dans une chambre climatique (avec un cycle de 16h de lumière à 20°C et 8h d'obscurité à 18°C avec 60% d'hygrométrie), l'évolution des symptômes a été notée sur 3 semaines, à raison d'un relevé par semaine.

Analyses statistiques

La normalité des données est testée à l'aide d'un test de Shapiro. L'homoscédasticité des variances est déterminée à l'aide d'un test de Bartlett. Si la normalité et l'homoscédasticité des données sont vérifiées, les données ont été analysées par une ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE) et un test à posteriori de Tukey. Si l'une des deux conditions n'est pas vérifiée, les données ont été analysées par un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, associé à un test a posteriori de Wilcoxon. Les comparaisons deux à deux de traitements en test non paramétrique ont été réalisées à l'aide d'un test de Mann-Whitney. L'ensemble des tests a été réalisé à l'aide du logiciel R.

Résultats

Effet de phytoprotection de F113 *via* des effets antagonistes et d'induction de résistance systémique et implication du DAPG

Symptômes de maladie causés par *F. graminearum* et biomasse foliaire du blé

L'analyse des symptômes de fusariose du collet a été réalisée grâce à une grille que nous avons établie, adaptée aux nécroses du collet. Notre échelle comporte 12 échelons, où 0 représente une plante sans nécrose et 12, une plante comportant au moins 4 tiges ayant des nécroses de plus de 2cm. Les témoins négatifs plantes ne présentent pas de nécroses, ce qui indique que le terreau utilisé ne comporte pas de phytopathogènes capables d'induire des nécroses au niveau du collet. Dans les témoins positifs pathogènes, une intensité de maladie égale ou supérieure à 11 a été observée.

Les résultats présentés en Figure 4 montrent que pour l'ensemble des traitements F113 et F113G22, les plantes présentent significativement moins de nécroses que le traitement témoin avec le pathogène seul ($P < 0,05$). Les traitements ISR et antagonisme avec F113 et F113G22 ne sont pas significativement différents entre eux ($P > 0,05$). Néanmoins, alors que les traitements antagonisme avec F113 et F113G22 semblent identiques, l'intensité des nécroses pour le traitement ISR avec F113 semble plus faible (réduction de 24%) que pour le traitement ISR avec F113G22. Au niveau de la biomasse foliaire, aucune différence significative n'a pu être détectée entre les différents traitements (Données non montrées).

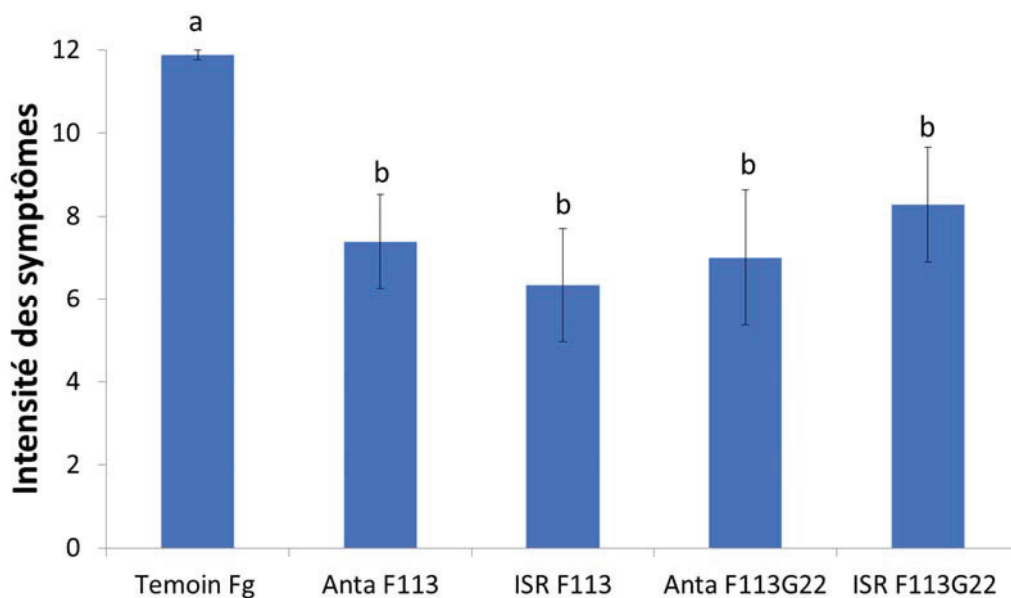


Figure 4 - Résultats de l'intensité des symptômes au niveau du collet en fonction des différents traitements.

Des lettres différentes traduisent une différence d'intensité de symptômes significative (Wilcoxon, $n=9$, $P < 0,05$).

Dynamique des populations microbiennes de *P. kilonensis* F113, de son mutant F113G22, et de *F. graminearum*

Les couples d'amorces utilisées dans cette étude pour quantifier par qPCR les populations de *P. kilonensis* et *F. graminearum* ont permis la quantification, avec une efficacité supérieure à 80% et un taux d'erreur inférieur à 5%, de 10^2 à 10^8 copies de l'IGS 18S-28S pour *F. graminearum* et de 10^2 à 10^7 copies d'un fragment d'ADN spécifique de la souche F113 et de son mutant F113G22. Les courbes de fusions ont montré la présence d'un seul pic, relevant une bonne spécificité d'amplification. Les populations microbiennes ont été exprimées par gramme de matière sèche (que cela soit pour le collet ou pour les racines et le sol adhérent) et analysées au sein de 3 compartiments différents du système 'split-root' : les 2 compartiments racinaires dans lesquels les populations ont ou n'ont pas été inoculées et le compartiment collet. Un biais ayant été observé vis-à-vis du nombre de racines présentes de façon aléatoire dans les différents compartiments (résultat non montré), les résultats n'ont pas pu être

exprimés en niveaux de populations totales par compartiment racinaire. Pour le champignon *F.graminearum*, les résultats de qPCR sont exprimés en nombre de copies d'ADN de l'IGS 18S-28S/g matière sèche et pour les populations bactériennes en nombre de cellules/g de matière sèche. Dans les témoins plantes, les niveaux des populations de *P. kilonensis* et *F. graminearum* quantifiés par qPCR sont inférieurs aux seuils de détection. Ces seuils sont de 10^5 cellules/g de matière sèche pour *P. kilonensis* F113 ou F113G22 et 10^6 copies d'IGS 18S-28S/g de matière sèche pour *F. graminearum*.

Au niveau du collet, aucune différence significative de colonisation par *F. graminearum* entre les différents traitements où *F. graminearum* est présent n'a été observée (Figure 5). Au contraire, il y a une différence significative de colonisation par *P. kilonensis* entre le traitement antagonisme avec F113G22 et les traitements ISR avec F113, et antagonisme avec F113 ($P<0,05$). Le traitement ISR avec F113G22 n'est par contre pas significativement différent des traitements antagonisme avec F113 et F113G22 ainsi que ISR avec F113 (Figure 6). Pour tous les traitements, les niveaux de population de *P. kilonensis* F113 (et de son mutant) sont, au niveau du collet, au-dessus de 5.10^6 cellules/g de matière sèche, un résultat non-attendu, F113 étant davantage connu pour coloniser efficacement la rhizosphère des plantes.

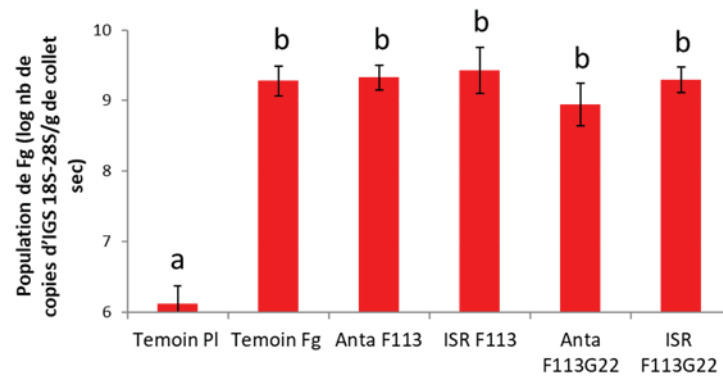


Figure 5 - Quantification par qPCR de la population de *F. graminearum* présente dans le collet dans les différents traitements.

Deux lettres différentes signifient une différence significative de colonisation au niveau du collet, pour les différents traitements étudiés (Wilcoxon, n=5, P<0,05).

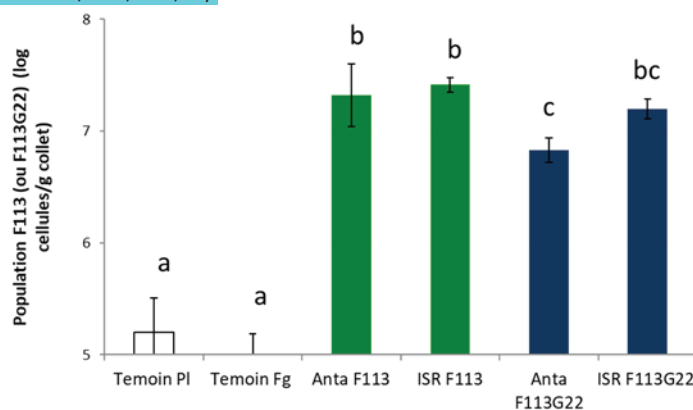


Figure 6 - Quantification par qPCR des populations de *Pseudomonas kilonensis* F113 ou F113G22 au niveau du collet du blé.

Les histogrammes en vert signifient que les traitements ont été inoculés avec F113 et les histogrammes en bleu que les traitements ont été inoculés avec F113G22. Des lettres différentes signifient une différence significative de colonisation au niveau du collet entre les différents traitements étudiés (Wilcoxon, n=5, P<0,05).

Au niveau des compartiments racinaires, l'intérêt s'est porté sur plusieurs points : (i) le niveau de colonisation des micro-organismes entre les deux compartiments racinaires pour un même traitement ; (ii) les niveaux de populations des micro-organismes quand ils sont introduits dans un même compartiment ; (iii) le niveau de colonisation de *F. graminearum* dans les compartiments où il n'a pas été introduit en présence de *P. fluorescens* F113 et F113G22.

Dans chaque traitement où *Fg* a été introduit, les populations fongiques retrouvées sont d'environ 10^9 copies d'ADN par gramme de racine-sol adhérent (Figure 7). Il est donc possible de dire que le champignon a été capable de s'installer au niveau de la rhizosphère. Mais il est à noter que *Fg* a été aussi retrouvé dans les compartiments où il n'a pas été inoculé, toutefois dans des quantités plus faibles de l'ordre de 10^8 copies d'ADN par gramme de racine-sol adhérent. Dans le témoin négatif, le champignon se situe en dessous du seuil de détection ($<10^6$ copies d'ADN par gramme de sol-racine adhérent). Pour les populations de *P. kilonensis* (F113 ou F113G22), des observations similaires sont réalisées (Figure 8). Ces résultats montrent que F113, F113G22 et *Fg* sont tous capables de coloniser le compartiment où ils n'ont pas été introduits à partir des racines.

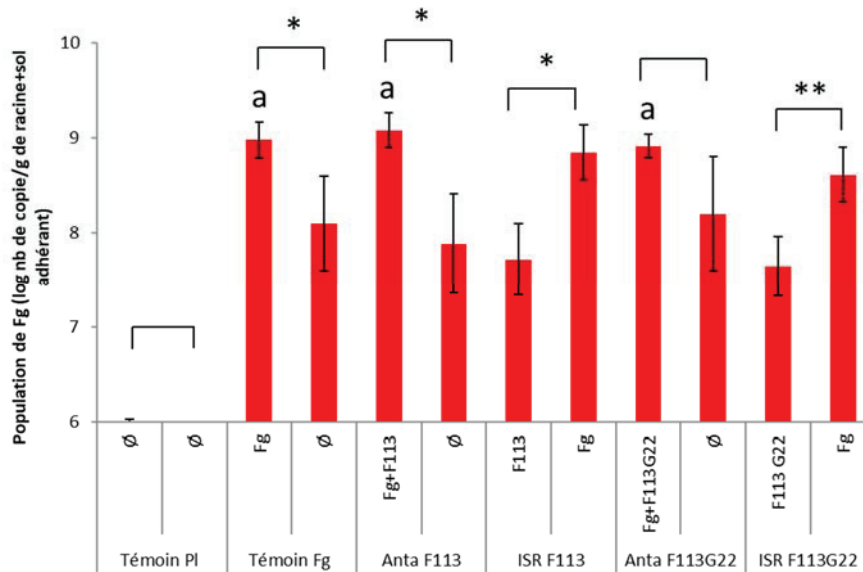


Figure 7 - Quantification des populations de *F. graminearum* au niveau des racines du blé dans les différents traitements.

Pour chaque traitement, les populations sont quantifiées dans chaque compartiment racinaire. ∅ signifie qu'aucune inoculation n'a été faite. Fg signifie que *F. graminearum* a été inoculé dans le compartiment considéré. F113 ou F113G22 signifie que la souche F113 ou son mutant F113G22 a été inoculé dans ce compartiment. Les étoiles signifient une différence significative de colonisation entre les deux compartiments d'un même traitement. Une même lettre signifie qu'il n'y a pas de différence de colonisation racinaire de *F. graminearum* quand il est seul dans un compartiment ou en présence de *P. fluorescens* F113 ou de son mutant F113G22 (Wilcoxon, n=5, P<0,05).

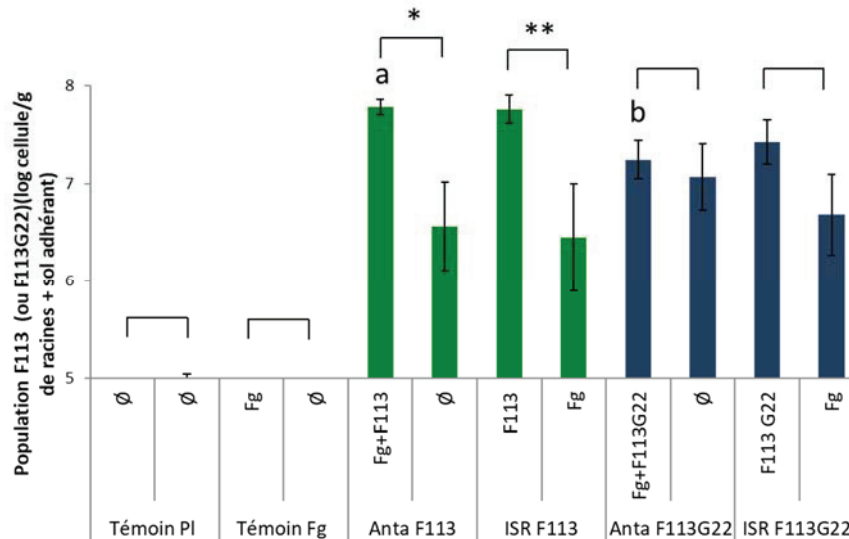


Figure 8 - Quantification des populations de F113 ou F113G22 au niveau des racines du blé dans les différents traitements.

Les histogrammes en vert signifient que les plantes ont été inoculées avec F113 et les histogrammes en bleu que les plantes ont été inoculées avec F113G22. Pour chaque traitement, les populations sont quantifiées dans chaque compartiment racinaire du système 'split-root'. ∅ signifie qu'aucune inoculation n'a été faite. Fg signifie que *F. graminearum* a été inoculé dans ce compartiment. F113 ou F113G22 signifie que F113 ou son mutant F113G22 a été inoculé dans le compartiment. Les étoiles signifient une différence significative de colonisation entre les deux compartiments d'un même traitement. Une lettre différente signifie une différence entre les traitements Anta F113 et Anta F113G22 dans un même compartiment comparé (Wilcoxon, n=5, P<0,05).

En comparant le compartiment où *Fg* a été introduit dans le témoin positif avec les compartiments où *Fg* et F113 (ou F113G22) ont été introduits dans le même compartiment, c'est-à-dire dans les traitements Antagonisme avec F113 (ou avec F113G22), il est observé que F113 ou F113G22 n'inhibent pas significativement la population de *Fg* ($P=0.82$). Lorsque l'on compare les niveaux de colonisation racinaire de *Fg* dans les compartiments où ce dernier n'a pas été introduit (pour les traitements : témoin positif *Fg*, ISR avec F113 et ISR avec F113G22), aucune différence significative n'est également observée ($P=0,20$). Ce résultat indique que F113 ou F113G22 n'a pas d'effet sur la colonisation des racines de blé par *Fg* à distance du site de d'introduction initiale du pathogène dans les pots 'split-root'. Il est possible d'en déduire que le DAPG, en tant que molécule antimicrobienne ne semble pas être impliquer dans l'inhibition de *Fg in planta*, en particulier au niveau racine.

Etude de l'implication des gènes de défenses dans la phytoprotection du blé par F113

Dans cette expérience préliminaire, l'expression de 5 gènes de défenses du blé a été analysée : PR-2, PR-5, PAL-2, PR-10, PR-4. PR-2 code pour une β -glucanase qui est une enzyme hydrolytique dégradant les β -glucanes de la paroi fongique, ceci permettant la libération d'éliciteur associé à la mise en place de la SAR. PR-5 code pour une protéine thaumatine-like qui aurait un effet dans l'inhibition fongique par création de lésions dans les hyphes. PAL-2 code pour la première enzyme impliquée dans la voie des phénylpropanoïdes, voie permettant la synthèse de la lignine mais surtout de l'acide salicylique, une hormone clef impliquée en particulier dans le déclenchement de la SAR. PR-10 code pour une protéine ribonucléase-like et est souvent associé à une réponse au stress, pour autant son mode d'action reste encore inconnu. Et PR-4 code pour une chitinase, capable de dégrader la paroi fongique. En parallèle, le suivi de la transcription des gènes de virulence du champignon était prévu, mais aucun transcrit fongique n'a pu être détecté.

Les résultats sont exprimés en fonction de leur facteur d'induction par rapport à la condition témoin plante ne contenant ni bactérie, ni pathogène (Tableau 4). Les résultats obtenus présentent une très grande variabilité, rendant leur interprétation hypothétique. Le premier constat pouvant être fait est que l'inoculation avec le pathogène seul semble augmenter fortement la transcription des gènes de défenses étudiés hormis les gènes codant PAL-2. Le traitement avec la bactérie seule semble fortement augmenter la transcription du gène codant PR-5, encore plus fortement que le traitement avec le champignon seul au bout de 9jpi. Mais l'impact de F113 seule sur l'expression des autres gènes étudiés semble être faible. Pour ce qui est du traitement bactérie + pathogène, le gène codant pour PR-4 est

fortement exprimé au bout de 7jpi, mais pour les autres gènes, la bactérie tend à fortement réduire le niveau d'induction de leur transcription, observée par ailleurs avec la condition *Fg* seul.

Tableau 4 - Facteurs d'induction de l'expression des gènes de défense du blé, au cours du temps, en présence du pathogène *F. graminearum* *Fg1* et/ou de la souche *P. kilonensis* F113

Gènes de défense	Traitements microbiens	Facteur d'induction à différent temps (indiqués en jours)			
		4	7	9	14
PR-2	F113+Fg	0,44 ± 0,30 24,56 ±	1,00 ± 0,36	1,30 ± 1,05	8,64 ± 6,72
	Fg	23,59	17,17 ± 13,65	12,40 ± 4,82	14,39 ± 4,53
	F113	0,33 ± 0,1	0,27 ± 0,08	2,20 ± 1,49	0,17 ± 0,04
PR-5	F113+Fg	0,53 ± 0,41	0,32 ± 0,06	4,64 ± 4,04	0,07 ± 0,04
	Fg	1,31 ± 1,11	5,58 ± 4,46	19,05 ± 15,01	0,01 ± 0,003
	F113	0,60 ± 0,51	0,79 ± 0,71	48,83 ± 16,54	29,45 ± 15,01
PAL-2	F113+Fg	0,24 ± 0,05	0,65 ± 0,17	1,48 ± 0,80	1,21 ± 0,33
	Fg	2,25 ± 1,97	1,64 ± 0,86	0,75 ± 0,47	0,75 ± 0,04
	F113	0,40 ± 0,28	0,39 ± 0,13	1,17 ± 0,62	1,22 ± 0,49
PR-10	F113+Fg	0,51 ± 0,29	0,62 ± 0,50	0,39 ± 0,21	2,04 ± 0,86
	Fg	9,06 ± 8,32	12,62 ± 11,50	8,68 ± 7,78	13,77 ± 9,05
	F113	0,49 ± 0,40	0,25 ± 0,21	2,17 ± 0,82	1,70 ± 1,28
PR-4	F113 + Fg	0,27 ± 0,07	8,05 ± 6,03	3,15 ± 2,52	1,17 ± 0,50
	Fg	1,49 ± 1,48	5,50 ± 4,77	20,13 ± 10,09	0,94 ± 0,40
	F113	0,21 ± 0,12	1,32 ± 0,58	3,01 ± 1,02	0,13 ± 0,06

Transmission d'un signal de défense entre racines de plants de blé

Comme précédemment, les tests réalisés sont des tests préliminaires avec 5 réplicats par traitement et une répétition biologique. L'intensité des symptômes est plus importante pour les plantes B et C (Figure 9), qui ont reçu 2×10^3 spores de *Fg* sur l'ensemble de leur système racinaire par rapport à la plante A qui n'en reçoit que 1×10^3 spores de *Fg* (cf Figure 3 M&M). L'intensité des symptômes de la plante A dans le témoin positif (pathogène seul) est assez faible par rapport aux symptômes observés dans les expériences menées dans la première partie de ce chapitre. Pour les plantes B et C, les valeurs d'intensité de nécroses du témoin positif sont en adéquation avec les valeurs trouvées dans l'expérience de 'split-root' simple. Pour cette expérience, aucune différence entre les traitements n'est apparue statistiquement différente, mais des tendances peuvent quand même être observées. L'intensité des nécroses semble avoir évolué différemment au cours des 3 semaines de relevés entre le témoin positif et le traitement avec F113. Alors que l'intensité des nécroses est relativement stable pour chaque plante, hormis pour la plante B au cours du temps pour le témoin positif, une décroissance

de l'intensité des symptômes est visible, pour les plantes A mais également B, en présence de F113. Toutefois, les différences par rapport au témoin pathogène seul ne sont pas statistiquement significatives. Dans la plante C, il n'y a pas de différence significative entre le témoin positif et le traitement avec F113. Cette observation semble mettre en avant une possible communication entre les racines d'un plant de blé ayant été inoculé avec F113 et un plant non-inoculé par la bactérie (plante B), en permettant d'améliorer sa protection vis-à-vis du pathogène. Néanmoins, les résultats obtenus pour la plante A ne sont pas aussi marqués que ceux observés dans l'expérience de 'split root' simple, c'est-à-dire une diminution significative de l'intensité des symptômes lors que le blé est inoculé avec F113. Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent une possible communication inter-racinaire, mais cette tendance doit être vérifiée en renouvelant l'expérience avec plus de répétition biologique et un plus grand nombre de réplicats.

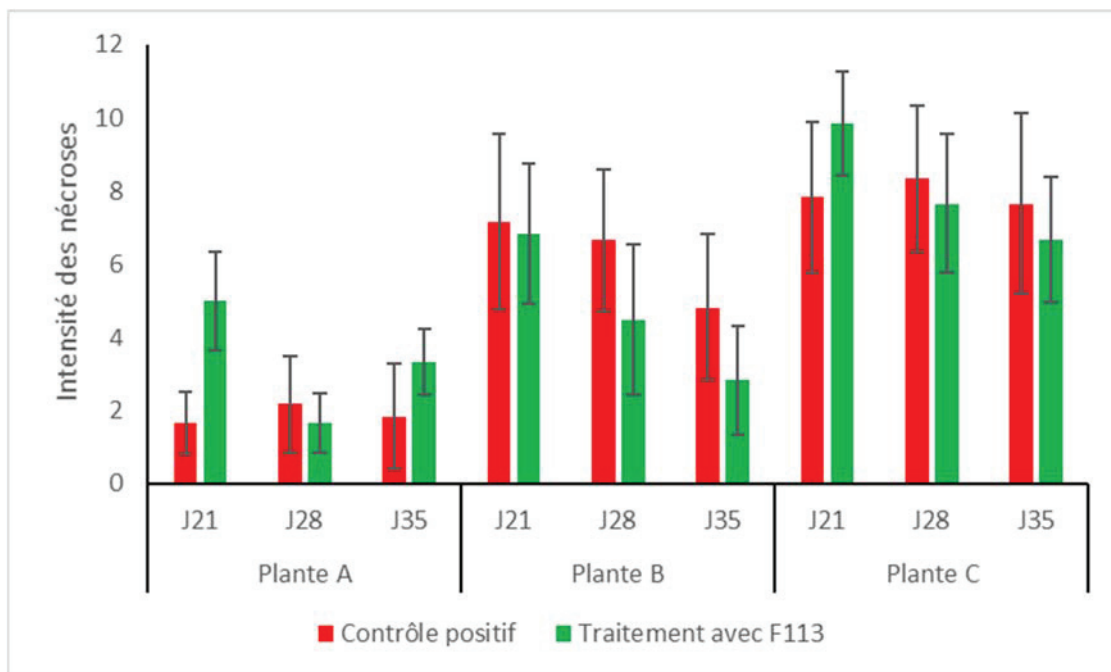


Figure 5 - Intensité des nécroses au niveau du collet du blé dans l'expérience de triple-split-root.

Les histogrammes en rouge correspondent au traitement inoculé avec *F. graminearum* et les histogrammes en vert correspondent au traitement inoculé avec *P. kilonensis* F113. Pour chaque plante du triple split-root, l'intensité des nécroses n'est pas significativement différente dans le temps, aussi bien pour le traitement avec *Fg* que celui avec *Fg*+F113 (Kruskall-Wallis, $P > 0,05$). Hormis pour la plante A à 21 jours post infection, il n'y a pas de différence significative entre les traitements *Fg* et F113 (Kruskall-Wallis, $P > 0,05$). Il n'y a pas non plus de différence significative d'intensité des nécroses entre les plantes B et C à un même temps post-infection, que cela soit pour le traitement *Fg* ou *Fg*+F113 (Kruskall-Wallis, $p > 0,05$). Aucune lettre n'est donc indiquée.

Discussion

Effet phytoprotecteur de F113 sur le blé vis-à-vis de *Fg* et implication du DAPG

Dans ce chapitre, le choix a été fait d'utiliser la souche modèle *Pseudomonas kilonensis* F113 pour les expériences. Si elle n'est pas la bactérie qui semble la plus efficace contre *F. graminearum* *Fg1* d'après les tests de sélection effectués dans ce travail (cf. partie 1), elle était disponible au sein de l'équipe 'Rhizosphère' et présentait l'avantage de la disponibilité de mutants, en particulier la souche F133G22, mutée dans les gènes impliqués dans la biosynthèse de DAPG, un métabolite secondaire connu pour des effets antimicrobiens mais aussi comme molécule de communication à plus faible concentration (Combes-Meynet et al., 2011). Ceci a donc permis d'étudier le rôle du DAPG dans la protection du blé par F113 vis-à-vis de *Fg*.

Afin de déterminer la part relative de l'antagonisme et de l'ISR dans la protection du blé par F113, un système de 'split-root' a été utilisé. Ce système permet de diviser le système racinaire en deux parties égales, qui vont être introduites dans deux compartiments différents. Ce système évite donc toutes formes de communications autres que racinaire entre les deux parties du système racinaire. Mais dans notre étude, il a pu être observé que F113, F113G22 et *Fg* étaient capables de coloniser l'ensemble de la plante car ils ont pu être retrouvés à la fois sur le collet mais aussi dans les compartiments où ils n'avaient pas été introduits. Il serait intéressant de voir par quelle(s) voie(s) ces micro-organismes sont capables de coloniser de nouveaux espaces : soit en longeant la racine à sa surface ou bien directement par l'intérieur de la racine. Pour cela, un suivi dans le temps de la propagation de ces micro-organismes le long de la plante (racine et collet) pourrait être mis en place.

Le système split root devait nous permettre d'étudier l'induction de réponses systémiques (ISR) indépendamment de mécanismes directs d'antagonisme. Toutefois, la réciproque n'était pas forcément vraie. Dans les conditions d'antagonisme (*i.e* quand le pathogène est en présence de la bactérie), il est difficile de faire la distinction entre les effets directs d'antagonisme de F113 et les effets indirects de F113 *via* la mise en place de l'ISR. Afin d'analyser l'impact de l'antagonisme sur la population de *Fg*, le suivi des symptômes a été couplé à une quantification des populations fongique et bactérienne au sein des racines de chaque compartiment et du collet, par PCR en temps réel. Les mises en place des réponses ISR étant souvent courtes (quelques jours), nous pouvons émettre l'hypothèse que la colonisation des compartiments non inoculés n'a pas impacté le processus de mise en place de l'ISR dans ces compartiments et favoriser des effets d'antagonisme avec *Fg*.

Dans un premier temps, un effet phytoprotecteur des traitements avec F113 et F113G22 a pu être mis en avant, aussi bien dans la condition antagonisme que dans la condition ISR, grâce à la réduction

statistiquement significative de l'intensité des nécroses du collet par rapport au témoin positif. Les effets de phytoprotection semblent plus efficaces en condition ISR avec le traitement F113 qu'en condition antagonisme avec le même traitement (sans que toutefois il y ait des différences statistiquement significatives entre ces 2 traitements). Des résultats similaires ont été observés par l'équipe de De Vleeschauwer qui a montré que la résistance du riz à un pathogène fongique, *Magnaporthe oryzae* par la bactérie bénéfique *Serratia plymuthica* IC1270 résulterait davantage de l'induction d'une réponse ISR que de l'antagonisme direct contre le pathogène (De Vleeschauwer et al., 2009). Kazan et collaborateurs en analysant les résultats obtenus par différentes équipes concernant la protection des céréales vis-à-vis de *Fg* aboutissent à la même conclusion (Kazan et al., 2012). Le rôle du DAPG dans l'antagonisme semble assez faible, car les résultats d'intensité de nécroses dans la condition antagonisme avec les traitements F113 et F113G22 sont semblables. Cela semble suggérer que d'autres molécules que le DAPG chez F113, tel que l'HCN (Schippers et al., 1990), permettraient l'inhibition directe de *Fg*. Si dans la littérature, le DAPG est connu pour être un antimicrobien, les tests sont souvent réalisés *in vitro* (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani, 2009; Cronin et al., 1997; Notz et al., 2001). Une étude sur la pomme de terre a pu montrer les effets positifs de l'inoculation de bactéries productrices de DAPG en serre et au champ (Velusamy et al., 2006). Dans notre étude, les effets antimicrobiens du DAPG vis-à-vis de *Fg* sont très limités, que cela soit *in vitro* ou *in planta*. Pour s'assurer que la bactérie est capable de produire le DAPG dans les conditions *in planta* de notre expérience, il faudrait pouvoir détecter et quantifier la production de DAPG au niveau des racines pour s'assurer qu'il est produit dans ces conditions, afin de pouvoir conclure sur la faible efficacité du DAPG à inhiber *Fg in planta*. La quantité de *Fg* dans les racines et le collet ne semble pas impactée par la présence de F113 ou F113G22.

Comme indiqué précédemment, dans la condition antagonisme il n'est pas possible d'occulter entièrement la part de l'ISR qui pourrait être mise en place dans ce traitement. Cet effet ISR pourrait être la cause de l'effet phytoprotecteur observé avec la souche F113. Le DAPG pourrait être impliqué dans la mise en place d'une réponse systémique. En effet, l'inoculation par F113 permet une diminution de 24% de l'intensité des nécroses en condition ISR par rapport à une inoculation avec F113G22, sans toutefois obtenir de différence statistiquement significative. Dans la littérature, le DAPG est connu pour être un éliciteur de la réponse systémique pour d'autres modèles que le blé comme *Arabidopsis thaliana* ou la tomate (Peter A. H. M. Bakker et al., 2007; Iavicoli et al., 2003).

A notre connaissance, notre étude serait la première mettant en avant une possible implication du DAPG dans la mise en place d'une réponse systémique chez le blé. Toutefois, un effet phytoprotecteur est également observé dans la condition ISR contenant le traitement avec F113G22, laissant suggérer que le DAPG ne serait pas le seul éliciteur de la mise en place d'une résistance systémique. De plus,

l'effet phytoprotecteur ne semble pas impacter la croissance du champignon, car il est retrouvé à des niveaux de populations, dans les racines inoculées avec *Fg* ou bien dans le collet, identiques entre le témoin positif et les conditions antagonisme et ISR que cela soit avec les traitements avec F113 ou F113G22. Au niveau du collet, la zone n'a pas été stérilisée avant broyage et extraction de l'ADN. Cela signifie que le champignon est soit à l'intérieur des tiges soit à leur surface. A notre connaissance, aucune étude n'a démontré la capacité de *Fg* à remonter jusqu'à l'épi *via* l'intérieur de la tige. Du fait que le niveau de population fongique n'est pas significativement impacté par la présence des souches F113 et F113G22, nous avons donc fait l'hypothèse que F113 et son mutant devaient impacter la virulence et/ou l'entrée du champignon dans les cellules végétales.

Etude de l'induction des gènes de défenses lors de l'interaction tripartite blé-*Fg*-F113

Pour tester ces hypothèses, de nouvelles expériences en pot, sans système 'split-root', ont été menées sur l'effet de l'inoculation de F113 sur les transcrits des gènes de virulence de *Fg*. Nous avons étendu cette étude à quelques gènes codant des protéines impliquées dans la réponse à un stress biotique, en particulier les protéines PR (pour *Pathogenesis Related*). Une réponse systémique doit permettre une réponse plus forte de la plante lors d'une seconde infection par un pathogène dans le cas de la SAR (*Systemic Acquired Resistance*), ou lors d'une première infection par un pathogène dans le cas d'une ISR induite par un micro-organisme non pathogène. Cela signifie que la mobilisation des mécanismes de défense (dont font partie les protéines PR) devrait être plus importante et plus rapide dans une réponse systémique.

Dans les résultats que nous avons obtenus, il n'a pas été possible de détecter des transcrits permettant d'attester de la présence de *Fg* ou de l'expression de ses gènes de virulence (résultats non montrés). Contrairement à l'expérience en 'split-root', cette expérience a été menée sur des temps plus courts allant de 4 à 14 jours. Ce laps de temps n'a sans doute pas permis au champignon d'atteindre le collet. Si dans les grains, 14 jours sont suffisants pour voir une infection par *Fg* (Chetouhi et al., 2015), cela ne semble pas être le cas dans l'étude de la fusariose du collet. Dans la littérature, les réponses systémiques sont souvent étudiées sur des temps assez variables, de quelques heures post-infection à quelques jours (Burkhanova et al., 2017; Li et al., 2010; Wang et al., 2017). Dans notre cas, il s'agissait d'une première étude pour laquelle nous avons peu de travaux de référence. Nous avons donc choisi des temps espacés de quelques jours, en espérant couvrir la fenêtre d'activation des gènes de défense.

Le traitement avec uniquement le pathogène a permis de mettre en avant une réponse des gènes codant pour les protéines PR. L'inoculation du pathogène semble donc induire une réponse de défense

importante chez le blé. Avec l'inoculation de la bactérie, nous avons fait l'hypothèse, en accord avec ce qui est trouvé dans la littérature, d'un effet « priming », donc d'une réponse du blé à l'infection par *Fg* plus forte et plus rapide. A priori, dans les données à notre disposition, rien ne confirme cette hypothèse. Au contraire, il semble qu'il n'y ait pas de réponse de défense majeure induite chez le blé en présence de *Fg* et F113.

Compte tenu de ces résultats, plusieurs hypothèses de travail peuvent être réalisées. Première hypothèse, l'inoculation de la bactérie au niveau racinaire, dans le même compartiment que *Fg*, pourrait induire soit une inhibition directe de la survie du pathogène dans la rhizosphère, ne permettant pas à *Fg* d'induire une réponse suffisante de la plante au niveau du collet. Dans l'expérience précédente, l'inoculation de F113 dans le même compartiment que *Fg* ne semblait pas impacter la croissance et la prolifération de *Fg*. Au vu donc des résultats déjà obtenus, cette hypothèse, si nous ne pouvons formellement la réfuter ne semble pas être l'hypothèse la plus plausible.

Deuxième hypothèse, l'inoculation préalable de la bactérie à bien induit une résistance, et particulièrement au niveau des racines. De ce fait, la plante, en réponse, a densifié sa paroi, la rendant plus résistante à l'infection par *Fg*. Les capacités d'infection de *Fg* étant réduites, il lui est difficilement possible d'infecter le blé, se traduisant par une faible réponse au niveau du collet. Pour vérifier cette hypothèse, l'étude des gènes de réponse du blé devraient être faite, en parallèle, au niveau des racines et un système split root pourrait être aussi envisagé. En effet, les études sur la transcription des gènes de défenses sont souvent effectuées au point de contact entre le pathogène et la plante. Dans notre cas, nous avons choisi d'étudier la réponse dans un compartiment de la plante, le collet, différent du point d'infection, les racines.

La troisième hypothèse pouvant être faite est que les voies menant à la mise en place d'une résistance systémique ne sont pas les mêmes qu'elles soient élicitées par F113, une bactérie non pathogène ou bien par *Fg*, un pathogène fongique. Cette hypothèse fait écho à de nombreux travaux en particulier ceux de Pieterse et collaborateurs, qui ont montré, chez *Arabidopsis thaliana*, que l'inoculation avec une bactérie non pathogène, *Pseudomonas fluorescens* WCS147 n'induisait pas les mêmes voies de réponses que lors de l'inoculation du pathogène, *Fusarium oxysporum* (Pieterse et al., 2001). Par exemple, les gènes codants pour les protéines PR n'étaient pas induits, alors qu'ils l'étaient lors de l'inoculation avec le pathogène.

Pour répondre à ces hypothèses, nous pourrions nous intéresser aux molécules signales impliquées dans la mise en place de la résistance systémique. Il existe trois molécules bien décrites comme molécules signales : l'acide salicylique, le jasmonate et l'éthylène (Delaney et al., 1994; Dong, 1998; C. M. J. Pieterse and van Loon, 1999). L'acide salicylique est impliqué dans la réponse de type SAR alors

que le jasmonate et l'éthylène sont plutôt impliqués dans les réponses de type ISR. A notre connaissance, très peu d'études se sont intéressées au rôle de ces molécules dans la résistance systémique chez le blé.

Toutefois, une étude de Makandar et collaborateurs a pu mettre en évidence le rôle de l'acide salicylique mais aussi du jasmonate, dans l'augmentation de la résistance à la fusariose de l'épi causé par *Fg* par l'induction d'une résistance systémique (Makandar et al., 2012). Pour cela, ils ont apporté une dose d'acide salicylique et de jasmonate au niveau du sol et ont constaté une augmentation de la résistance des épis à l'infection liée à une augmentation de la concentration de l'acide salicylique et du jasmonate dans les épis mais aussi des protéines de défenses activées par ces molécules signales tel que PR-1 pour l'acide salicylique ou l'AOS (*allene oxyde syntase*) pour le jasmonate.

Une autre étude, menée par Desmonds et collaborateurs, s'est intéressée au rôle du méthyl-jasmonate, un composé volatile, dans la résistance à la fusariose du collet causé par *Fusarium pseudograminearum* (Desmond et al., 2005). Le méthyl-jasmonate est un dérivé du jasmonate et est aussi utilisé par les plantes comme molécule de communication. Comme précédemment, pour étudier l'impact du méthyl-jasmonate, celui-ci a été appliqué directement par spray sur la plante, puis la plante a été encapuchonnée pendant deux jours pour s'assurer que le méthyl-jasmonate reste bien au contact de la plante. Grâce au suivi de nombreux gènes de défense, et en comparant avec un traitement au BTH (un analogue de l'acide salicylique), ils ont pu mettre en évidence que les niveaux de transcription des gènes induits par l'un ou l'autre des composés chimiques n'étaient pas les mêmes, supposant une différence de réponses en fonction de l'inducteur. De plus, le traitement avec le méthyl-jasmonate semblerait être plus efficace pour protéger de la fusariose du collet que le traitement avec le BTH, ce qui semblerait signifier que, si chez les dicotylédones l'acide salicylique semble être impliqué dans la mise en place de la résistance systémique après l'attaque d'un pathogène, chez les monocotylédones, et en particulier le blé, la voie du jasmonate semble plus appropriée pour la mise en place de la résistance systémique après l'attaque d'un pathogène. Ce résultat très intéressant permet d'étoffer les différentes voies impliquées dans la mise en place de la résistance systémique. Toutefois, à l'heure actuelle, très peu d'études ont pu mettre en avant le mécanisme d'induction d'une résistance systémique par un micro-organisme non pathogène chez le blé, et les mécanismes globaux de mise en place d'une résistance systémique restent encore à découvrir (Kogel and Langen, 2005a).

Communication racine-racine pour la diffusion de la résistance systémique entre des blés

Dans la dernière partie de nos expériences, nous voulions étudier une possible communication racine-racine lors d'un stress biotique, et évaluer la capacité d'un message à se transmettre à plusieurs plantes. Des communications aériennes entre différents individus d'une même population végétale suite à un stress biotique sont des phénomènes déjà démontrés (Frost et al., 2008; Heil and Karban, 2010; Van Hoven, 1984). Depuis peu, les scientifiques ont pu mettre en évidence de telles communications aussi au niveau des racines (Delory et al., 2016; Depuydt, 2014; Falik et al., 2012; Hodge, 2009).

Ces découvertes récentes offrent des perspectives bien plus larges dans la compréhension de la mise en place de résistance chez les céréales contre *F. graminearum*. C'est avec cet objectif que nous avons testé la capacité d'un signal à se transmettre par l'intermédiaire des racines. Grâce à plusieurs systèmes 'split root' consécutifs, il a été possible d'étudier une possible communication racine-racine. Les travaux débutés ne sont que préliminaires, mais les résultats obtenus méritent une attention particulière. En effet, même si nous n'avons pas de résultats significatifs, les systèmes ayant été inoculés avec F113 semblent présenter des effets phytoprotecteurs sur la deuxième plante, c'est-à-dire la plante n'étant pas en communication directe avec F113, mais en contact avec les racines appartenant à la plante inoculée avec F113. De plus, une tendance à une meilleure résilience semble être observée dans les plantes B et C quand il y a eu traitement avec F113. Ces résultats sont néanmoins à prendre avec mesure, les résultats obtenus pour la plante A n'étant pas concordants avec les résultats obtenus pour les plantes B et C. Toutefois, à la vue des différents résultats observés dans la littérature, et d'un nombre croissant d'études démontrant des communications racines-racines, une optimisation du dispositif expérimental ainsi que de la méthode d'évaluation des réponses de la plante serait envisageable. Si le système perfectionné permet d'obtenir des résultats concluants dans la protection du blé, des études de métabolomiques pourraient être envisagées avec pour objectif de trouver les métabolites qui pourraient être responsables des communications entre les racines d'individus différents d'une même population végétale.

Conclusion

Lors de cette partie, nous nous sommes intéressés à la capacité de F113 à protéger le blé vis-à-vis de *Fg*. Nous avons pu mettre en avant un effet d'ISR *in planta* grâce à un dispositif original, ainsi qu'une possible implication du DAPG dans la mise en place de cet effet ISR. Afin d'aller plus loin, nous avons essayé de trouver les mécanismes permettant la mise en place de l'ISR en nous intéressant aux gènes de défense codant pour des protéines PR ainsi qu'en évaluant la capacité de ce signal à se propager au sein de la rhizosphère par des expériences préliminaires. Si les résultats obtenus sont encourageants, une optimisation des protocoles reste nécessaire. Toutefois l'utilisation du système 'split root' semble

prometteur dans l'étude de l'ISR. Grâce à des études de métabolomiques, de nouvelles molécules ou mécanismes de communication entre plantes pourraient être découverts et permettre d'améliorer nos connaissances sur le monde souvent inexploré de la communication végétale et particulièrement sous-terrain.

Ce qu'il faut retenir de la partie

- ♣ Cette partie s'est intéressée à la capacité d'une souche modèle à induire une résistance systémique chez le blé.
- ♣ F113 est capable de protéger le blé de la fusariose du collet induite par *Fg*.
- ♣ Le DAPG pourrait être un potentiel éliciteur de l'ISR chez le blé.
- ♣ La communication racine-racine pourrait permettre une protection du blé au cours du temps suite à une attaque de *Fg*.

Discussion générale

De l'utilisation des biopesticides à l'agroécologie

Cette thèse s'est intéressée à la lutte biologique vis-à-vis de *Fusarium graminearum* (*Fg*), en particulier chez le blé. Ce travail de thèse CIFRE en partenariat avec la société BIOVITIS avait pour objectif principal d'explorer différentes pistes de Recherche, afin de permettre à la société de développer à moyen ou long terme un nouveau produit de biocontrôle contre les fusarioses du blé, basé sur l'utilisation de souches bactériennes. Les différentes étapes de ce travail sont résumées dans la Figure 1.

Recherche de d'agents bactériens candidats. La thématique étant nouvelle dans l'équipe de recherche, la première étape fut la construction d'une banque d'isolats bactériens provenant de la rhizosphère du blé, à cribler pour une potentielle activité antagoniste contre *Fg* (Chapitre 7). Dans la littérature, les principaux genres retrouvés, quand des micro-organismes sont utilisés en lutte biologique, sont les genres *Pseudomonas* et *Bacillus*. Afin d'explorer potentiellement de nouveaux genres bactériens, nous avons choisi de développer une approche non ciblée en utilisant un milieu non sélectif dilué, le TSA (Trypton soy agar) 1/10^{ème} pour construire cette banque. Nous avons conscience que ce milieu, même non sélectif, ne permet pas l'isolement de toutes les bactéries cultivables dans un sol. De plus, notre banque ne comprenait qu'un nombre limité d'isolats (n=205) ne permettant pas une exploration importante de la diversité bactérienne des sols. Néanmoins, nous avons pu isoler des bactéries de 32 genres différents. Quatre sols de différentes localités en France, ayant le blé comme plantes de culture, avaient été d'ailleurs choisis pour améliorer nos chances de sélectionner des bactéries assez diverses. Au cours de cette thèse, les sols n'ont pas été caractérisés, car nous nous sommes principalement concentrés sur les bactéries isolées de ces sols, ce qui explique qu'une faible attention leur ait été portée dans ce travail. Toutefois, il aurait pu être intéressant de mieux caractériser ces sols afin d'identifier des caractéristiques physico-chimiques favorables à l'établissement de bactéries inhibitrices ou non de *Fg*. En effet, les conditions physico-chimiques d'un sol vont influencer sur les ressources disponibles dans ces sols, mais également sur un ensemble de paramètres abiotiques et biotiques auxquels les microorganismes doivent faire face, et donc, par conséquent sur les micro-organismes qui peuvent être isolés dans ces sols (Gros et al., 2004; Šimek et al., 2000; Spain, 1990). Dans notre cas, l'historique cultural des sols n'était pas connu, ne permettant pas d'établir l'impact de cet historique sur le potentiel recrutement de bactéries bénéfiques pour la plante. Il a été montré que les pratiques culturales pouvaient impacter les communautés microbiennes présentes dans les sols (Buckley and Schmidt, 2001; Garbeva et al., 2006) et que l'inverse était aussi possible, c'est-à-dire que les communautés microbiennes peuvent impacter la diversité et/ou la productivité des espèces végétales présentes dans un écosystème (van der Heijden et al., 2008).

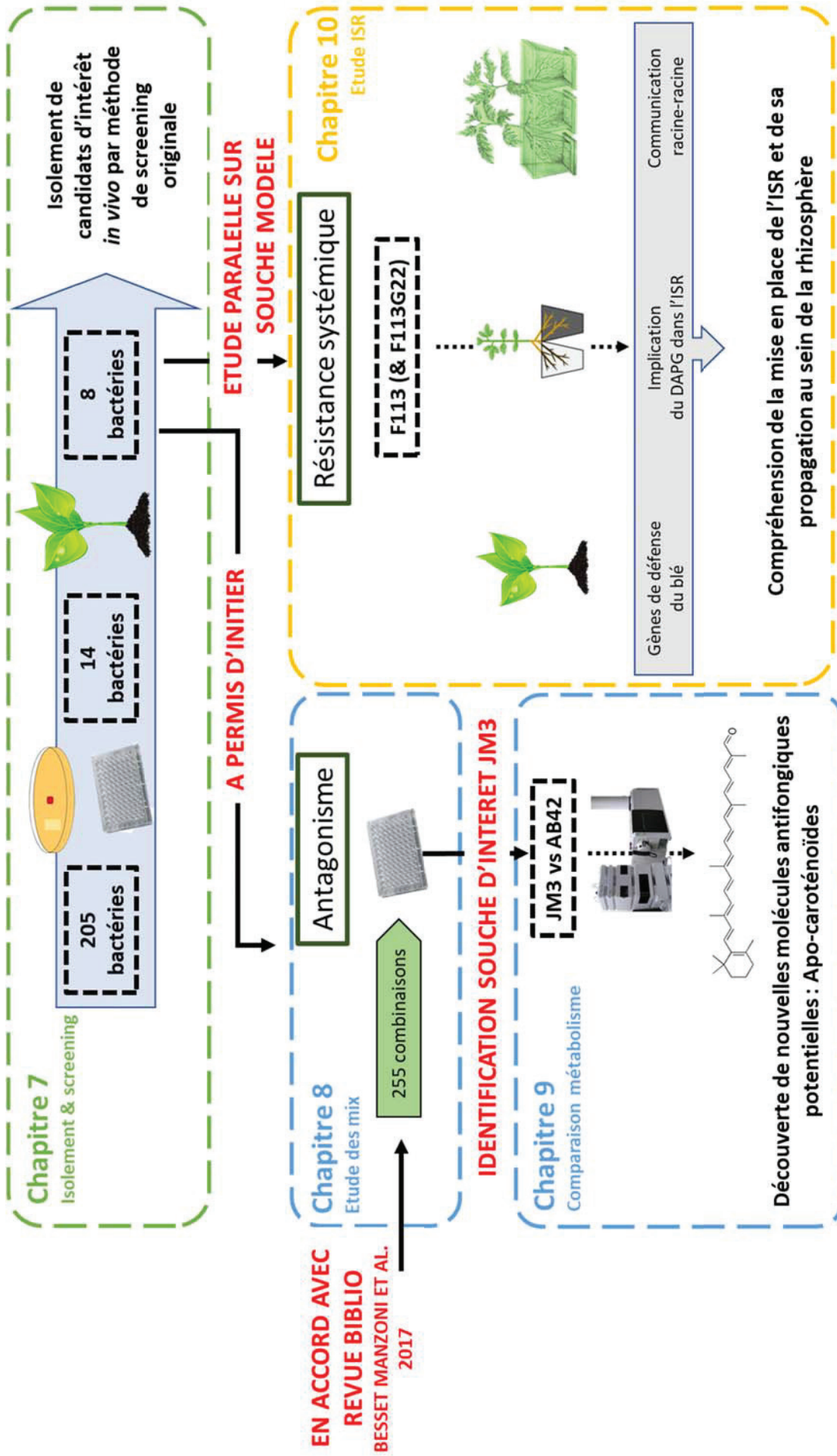


Figure 1 - Schéma récapitulatif des différents travaux effectués au cours de la thèse, avec les principaux buts atteints pour chaque partie.

De même, hormis pour le sol de Clermont, qui se situe sur une parcelle expérimentale de l'INRA où *Fg* est inoculé, l'historique de la pression parasitaire notamment en *Fg* sur les parcelles échantillonnées n'était pas connu. Or ce paramètre peut influencer la composition des communautés bactériennes présentes dans les sols. En effet, différents travaux dans la littérature montrent que des sols résistants et sensibles à des maladies fongiques, dans lesquels les niveaux de populations de pathogènes diffèrent, n'ont en effet pas les mêmes communautés bactériennes (Kyselková et al., 2009). Dans les sols résistants, une certaine partie de la communauté microbienne en place est capable de limiter les effets délétères de pathogènes dans un champ (Weller et al., 2002). A notre connaissance, il n'existe pas de sol connu pour une résistance spécifique à *Fg*, ce qui aurait pu constituer un point de référence pour la recherche de bactéries inhibitrices de *Fg*.

Classiquement, dans la recherche de bactéries utilisables pour la lutte biologique, tout commence dans une boîte de Petri. Le premier niveau de sélection consiste à tester les capacités des souches candidates à inhiber la croissance du pathogène *in vitro*. Les souches les moins inhibitrices sont mises de côté, car considérées comme à faible potentiel. La surreprésentation des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* dans la littérature pourrait venir d'ailleurs de leur bonne capacité à inhiber les pathogènes fongiques dans des tests de co-cultures *in vitro* (Ongena and Jacques, 2008; Santoyo et al., 2012; Sivasakthi et al., 2014).

La partie originale de nos travaux de sélection a consisté à garder ces souches à faible potentiel *in vitro*, et de préférence appartenant aux mêmes genres que des bactéries à fort potentiel. Cette approche a été motivée par la capacité de certains micro-organismes à induire une résistance systémique chez les plantes (Pieterse et al. 2001). Or, il a pu être montré dans nos travaux, que certaines souches, aux capacités d'inhibition *in vitro* limitées voire nulles, ont été efficaces pour protéger le blé *in planta*, telle que la souche JM79 (Figure 2). Si les mécanismes menant à cette protection n'ont pas pu être élucidés au cours de ces travaux de thèse, le résultat obtenu est très intéressant. Il pourrait remettre en lumière des souches longtemps laissées de côté, mais aussi des genres bactériens peu connus pour avoir des effets d'antagonisme *in vitro*, mais qui pourraient être efficaces dans l'induction d'une résistance systémique. Nous avons ainsi testé des genres peu utilisés en lutte biologique comme *Staphylococcus*, *Variovorax*, *Microbacterium*, *Arthrobacter* qui ont donné des résultats intéressants *in planta*, avec une capacité à protéger partiellement le blé contre la fusariose du collet.

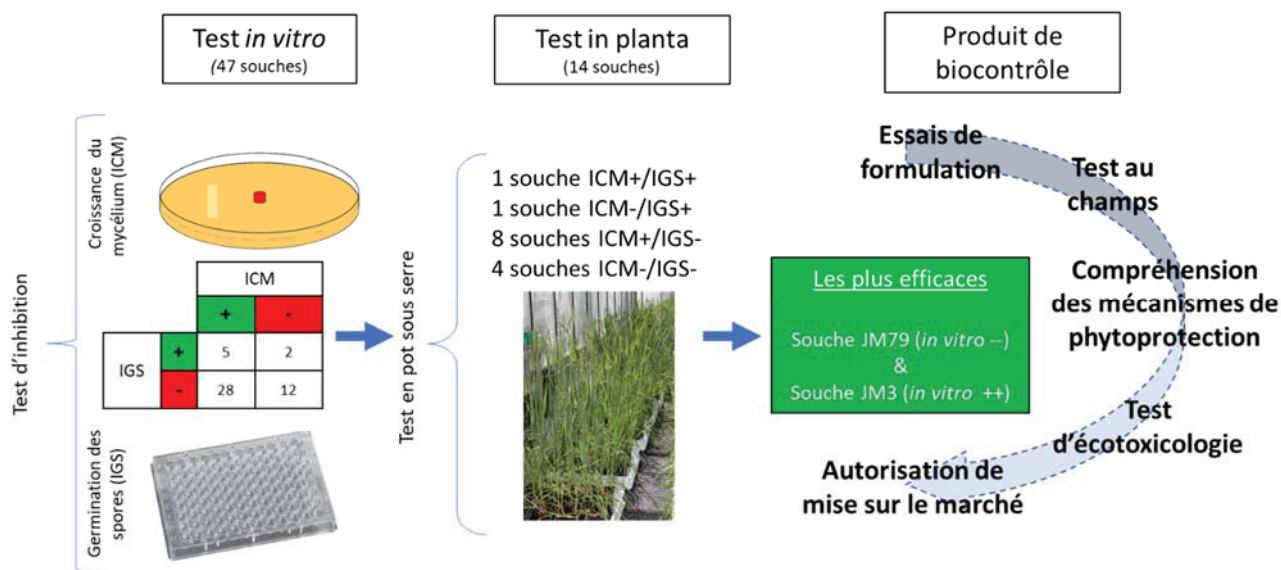


Figure 2 - Processus de sélection des bactéries en vue de produire un biopesticide.

Grâce à une sélection *in vitro* puis à une sélection *in planta*, deux souches JM3 et JM79, ont été retenues pour avoir eu les meilleurs résultats *in planta*. Dans le tableau est décrit les caractéristiques d'inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des spores de 47 souches à partir desquelles 14 ont été choisies pour des essais *in planta*. ICM: inhibition de la croissance mycélienne. IGS: inhibition de la germination des spores.

Si la fusariose du collet ne présente pas la principale menace pour les agriculteurs lorsque *Fg* est présent sur une parcelle, elle peut constituer un point de départ dans la sélection d'agents de biocontrôle, car elle permet de tester sur des temps n'excédant pas deux mois, l'effet protecteur ou non de solutions de biocontrôle. Toutefois, il serait intéressant d'élargir, dans un premier temps, les tests *in planta* aux autres maladies induites pas *Fg*, que sont la fonte des semis et surtout la fusariose de l'épi. Travailler sur la fusariose de l'épi représente l'inconvénient d'un temps d'études doublé voir triplé par rapport à la fusariose du collet. Mais cela présente aussi plusieurs intérêts. Premièrement, en allant jusqu'à l'épiaison, il est possible de déterminer un rendement final. Le grain constitue, pour la plante, sa descendance. A partir des grains, il est donc possible de calculer une fitness et donc d'étudier l'impact de *Fg* sur des traits écologiques majeurs pour une plante, que sont son potentiel reproducteur et sa survie à long terme. Le rendement constitue aussi la valeur marchande de la production pour un agriculteur. Plus ce rendement sera élevé, plus l'agriculteur pourra en tirer un bénéfice. Ceci permettrait donc de déterminer à la fois le niveau de protection dû à l'inoculation de la bactérie, mais aussi de pouvoir déterminer le potentiel effet de phytostimulation de cette bactérie, en réalisant un témoin plante inoculée uniquement avec celle-ci. Deuxièmement, *Fg* présente la particularité de produire des mycotoxines. Ces mycotoxines, présentes dans les grains, vont les rendre impropres à la consommation quand elles sont en forte concentration. Ceci constitue l'un des problèmes majeurs avec la fusariose de l'épi. La réduction de la présence des principales mycotoxines, le déoxynivalénol (DON) et le nivalénol (NIV), dans le grain constitue donc un facteur important à

prendre en compte lors de la sélection de bactéries comme agent de lutte contre *Fg*. Etudier la protection du blé vis-à-vis de ces différentes maladies impliquant *Fg*, grâce à l'inoculation de différentes souches d'intérêt, pourrait permettre d'observer si les souches seraient efficaces à chaque étape du cycle ou si certaines étapes constituent un point critique par rapport à leur efficacité à protéger le blé.

Par la suite, il serait possible de complexifier le système. Les résultats ont été obtenus à partir d'une culture d'une variété de blé appelée « Sumai-3 ». Cette variété est connue pour être relativement résistante à la fusariose de l'épi (voir synthèse bibliographique), mais plutôt sensible à la fusariose du collet (T. Langin, INRA Clermont Ferrand). Il serait intéressant d'élargir nos tests *in planta* à d'autres variétés de blé pour voir si les mêmes souches JM3 et JM79 sont les plus efficaces sur ces variétés. Il est communément admis que le génotype du blé peut influencer ses capacités à résister à *Fg* (Bai and Shaner, 2004) et que le génotype d'une plante influence son microbiote (Berendsen et al., 2012). Si les mêmes patrons de réponses étaient observés, nous pourrions faire l'hypothèse d'une réponse à l'inoculation bactérienne ainsi que d'un mécanisme de protection relativement bien conservés chez les différents génotypes.

Il serait également possible de faire varier le substrat utilisé pour faire pousser le blé. Dans les expériences que nous avons réalisées, nous avons utilisé du terreau. Un sol donc relativement pauvre en micro-organismes, mais riche en nutriments. En utilisant des sols contrastés, que cela soit en termes de richesse en nutriments ou en populations microbiennes naturellement présentes, nous pourrions suivre la capacité des souches d'intérêt à coloniser ces sols et à protéger le blé. Cette démarche, au vu d'une commercialisation à grande échelle d'un produit de biocontrôle est très importante. Elle pourrait démontrer le caractère ubiquiste d'un tel produit ou au contraire, permettre d'affiner les conditions d'utilisations du produit proposé (type de sol, condition de culture). Il pourrait être également envisagé de tester l'efficacité du produit sur d'autres pathogènes ou bien d'autres céréales. Toutes ces expériences permettraient de mieux caractériser les conditions d'utilisations du produit fini. Plus un produit est utilisable dans des conditions différentes plus il représente un fort intérêt.

Au-delà des expériences complémentaires qui pourraient être faites, les premiers résultats obtenus nous ont permis de valider que des bactéries ne présentant pas d'intérêts dans des tests de co-culture *in vitro* pouvaient néanmoins présenter une bonne efficacité *in planta*, et ouvrent donc la voie à de nouveaux modèles dans la sélection de bactéries en lutte biologique (Figure 2). Pour l'entreprise, plusieurs souches vont pouvoir être exploitées par la suite en vue de tester des modes de production à moyenne et grande échelle, et par la suite, de mener des essais au champ. Toutefois, le travail à

accomplir avant de réussir à développer un produit de biocontrôle est encore grand (Figure 2). La mise sur le marché d'un pesticide (chimique ou de biocontrôle) représente un très long travail en amont.

Nous n'avons pas pu, au cours de ces travaux de thèse, explorer plus amplement les résultats obtenus lors des tests *in planta* autant que nous l'aurions souhaité, par faute de temps, et nous n'avons pas pu explorer les mécanismes menant à la protection du blé par ces bactéries car l'obtention des souches d'intérêt suite au test *in planta* réalisé à l'INRA de Clermont-Ferrand, a été tardif. C'est pour cela que nous avons choisi de prendre une bactérie modèle, *P. kilonensis* F113, disponible dès le début des travaux de thèse, pour étudier la mise en place de la résistance systémique chez le blé.

Etude chez le blé de l'induction d'une résistance systémique par une PGPR modèle. Ces dernières années, une attention particulière a été portée sur l'induction d'une résistance systémique (ou ISR) par les micro-organismes non pathogènes chez les plantes, et de nouveaux mécanismes ont été ainsi décrits, impliquant de nouveaux éliciteurs microbiens ou voies de signalisation moléculaires au sein de la plante (Kunkel and Brooks, 2002; Pieterse et al., 2009; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Certaines études ont même mis en avant l'importance de la mise en place de l'ISR par rapport à un effet antagoniste direct des souches biocontrôle dans la protection des plantes (Henkes et al., 2011). Dans la partie 3 de cette thèse, le potentiel effet éliciteur du DAPG a été investigué. Si le DAPG avait déjà été décrit comme une potentielle molécule élicitrice d'une résistance systémique chez *Arabidopsis thaliana* (Iavicoli et al., 2003), à notre connaissance, peu d'études avait été réalisées chez le blé, et en particulier vis-à-vis de *Fg*. Si nos expériences n'ont pas pu établir une réelle implication du DAPG dans la mise en place d'une résistance systémique, nous avons cependant pu mettre en évidence que la souche modèle *P. kilonensis* F113 peut protéger le blé vis-à-vis de *Fg* lorsqu'elle n'est pas inoculée dans le même compartiment racinaire que le pathogène suggérant l'induction d'une réponse ISR. Pour étudier l'induction d'ISR, un système 'split-root' a été utilisé. Ce type de 'split-root' semble bien adapté à l'étude de l'ISR chez les céréales, car la division du système racine en deux parties n'est pas invasive pour la plante, contrairement aux plantes dicotylédones, où la racine doit être coupée en deux. Les expériences menées mériteraient d'être approfondies en augmentant le nombre de réplicats, afin que la variabilité observée puisse être réduite et nous permettre d'obtenir des résultats significatifs, s'ils doivent l'être. Le système 'split-root' s'est avéré être un modèle intéressant pour étudier la mise en place de l'ISR. Toutefois, le fait que la bactérie puisse migrer vers le compartiment où elle n'a pas été inoculée pourrait constituer un frein à l'utilisation d'un tel système. Un suivi des niveaux de populations microbiennes dans les différents compartiments racinaires devrait être réalisé pour comprendre la dynamique d'invasion du compartiment non-inoculé (si elle existe) et évaluer si cela peut interférer avec l'étude de l'induction d'une résistance systémique. Il a aussi pu être noté que le DAPG ne semblait pas être le seul éliciteur de la résistance systémique induite par F113 chez le blé, car

le traitement ISR avec le mutant ne produisant pas de DAPG (souche F113G22) s'est avéré aussi capable d'induire une résistance à *Fg*. Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'études sur les éliciteurs de F113 vis-à-vis de l'induction d'une résistance systémique. De manière plus générale, l'étude de l'induction d'une résistance systémique chez le blé par des bactéries est peu documentée, au contraire des mécanismes permettant la mise en place de cette résistance (Kogel and Langen, 2005b). Ces caractérisations sont souvent faites à l'aide de mutants de plante ou bien par le traitement des plantes avec des produits chimiques connus pour déclencher une réponse chez les céréales tels que l'acide salicylique, le BTH (ou benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester) ou le jasmonate. L'inoculation de bactéries semble donc être un défi de taille pour étudier la mise en place de l'ISR chez le blé et pourrait expliquer les difficultés rencontrées lorsque nous avons cherché à étudier l'expression des gènes de défense chez le blé suite à l'inoculation de F113. Ceci est sans doute dû au fait qu'une bonne interaction entre une plante et une bactérie inoculée, conduisant à l'expression des gènes ou à la production des molécules ayant une activité d'élicitation des défenses, n'est pas garantie à coup sûr. D'autant plus que ces bactéries ne sont pas forcément des bactéries retrouvées habituellement dans le microbiote racinaire du blé, ce dernier pouvant varier d'une variété à une autre (Mauchline and Malone, 2017). De plus, de nombreux facteurs environnementaux peuvent influencer la possible interaction d'un génotype de blé avec un inoculant. Toutes ces conditions à remplir peuvent interférer dans la description des mécanismes mis en place dans l'induction d'une résistance systémique par une PGPR. De manière indirecte, il est probablement plus facile de montrer l'effet d'une molécule seule dans l'élicitation des défenses, puis ensuite de montrer que cette molécule est produite par la bactérie d'intérêt, plutôt que d'utiliser une approche basée sur l'utilisation de mutants bactériens pertes de fonction.

Pour aller plus loin dans la compréhension de la mise en place de l'ISR chez le blé, il serait intéressant de combiner l'utilisation d'un 'système split-root' avec l'étude de l'expression des gènes de défense végétaux, afin de séparer physiquement le pathogène et la bactérie d'intérêt inoculés. Travailler sur la fusariose de l'épi pourrait permettre d'étudier la mise en place de l'ISR sans que l'antagonisme n'interfère, car l'inoculation du champignon aurait lieu sur l'épi et celle de la bactérie d'intérêt, dans le sol.

Suite à un stress biotique ou abiotique, des communications entre plantes d'une même espèce pourraient exister, en particulier d'individus stressés vers des individus sains de la population (Lambers et al., 2008). Ce dialogue est relativement bien décrit dans le cas des parties aériennes, mais les communications entre racines ont fait l'objet de moins d'études. Une revue de Hodges apporte une vue relativement globale de l'avancée des travaux dans ce domaine (Hodge, 2009). Falik et collaborateurs ont utilisé un système 'split-root' pour mettre en évidence une communication racine-

racine entre individus voisins permettant une meilleure résistance au stress hydrique et osmotique pour des plantes voisines non stressées (Falik et al., 2012). Dans leur étude, 4 plantes de différentes espèces ont été utilisées. Lors d'un stress hydrique ou osmotique, les stomates vont se fermer pour limiter les pertes en eau ou en osmolites. Pour mesurer la réponse aux différents stress appliqués, les auteurs de cette étude ont étudié la cinétique d'ouverture et fermeture des stomates. Ils ont pu montrer que l'application d'un stress sur une plante avait comme conséquence sur les plantes voisines non stressées, une fermeture des stomates de la même manière que la plante stressée, suggérant une communication racinaire. Les travaux que nous avons initiés rejoignent ces approches. Et, même si nous n'avons pas pu, pour le moment, démontrer d'effets positifs d'une communication racine-racine dans la protection vis-à-vis de *Fg*, il serait intéressant de poursuivre cette étude préliminaire pour comprendre comment des racines, et en particulier de blé, pourraient être capables d'établir une communication dans le sol afin de ralentir la propagation d'un agent pathogène, et d'identifier si ces communications sont spécifiques à une espèce (intra-spécifique) ou bien s'il s'agit de signaux plus génériques pouvant être captés par différents organismes au sein d'une communauté végétale (inter-spécifique).

Utilisation de consortia bactériens comme produits de biocontrôle. Les produits de biocontrôle ne sont souvent constitués que d'une seule souche, en raison d'une réglementation assez contraignante. En effet, chaque souche, même dans un mélange, doit faire l'objet d'une étude individuelle et non d'une étude sur l'ensemble du mélange. Pourtant, des études ont mis en avant les effets positifs de l'utilisation de consortium dans la lutte biologique ou bien dans la fertilisation biologique, études que nous avons synthétisées dans la revue présentée dans la partie bibliographique (Besset-Manzoni et al., 2018). Nous nous sommes donc intéressés à ces consortiums dans la 2^{ème} partie de cette thèse. L'idée était d'associer les bactéries présentant des effets de phytoprotection *in planta*, afin d'étudier de potentiels effets de synergie. Notre démarche fut ambitieuse en sélectionnant 8 bactéries et en effectuant une approche combinatoire c'est-à-dire en testant toutes les combinaisons possibles par 1, 2, 3 à 8 de ces souches, soit un total de 255 combinaisons. Le choix a été fait de tester ces combinaisons sur des tests *in vitro* en microplaque, dans un premier temps, afin d'évaluer leur capacité à inhiber la germination des spores de *Fg*. Le principal avantage de ce test réside dans notre capacité à tester en parallèle de nombreuses combinaisons dans un temps relativement réduit. Au vu du nombre de traitements, cette première étape en microplaque paraissait relativement adaptée, même si les travaux effectués dans le cadre de la sélection ont pu montrer les limites des tests *in vitro*. L'idée de cette démarche était double : découvrir s'il existait des synergies entre certaines bactéries et si l'ajout de bactéries à des bactéries efficaces, *in vitro*, n'affectait pas leur activité. En effet, une synergie entre bactéries pourrait permettre une meilleure inhibition dans le sol de l'inoculum primaire de *Fg* au

champ. L'absence de pertes d'activité des bactéries efficaces lors de l'ajout d'autres bactéries pourrait permettre de garder cette activité antifongique tout en ajoutant au sein du consortium d'autres fonctions bénéfiques à la plante. De façon originale, nous avons pu montrer que les combinaisons avec 4 souches sont parmi celles qui sont les plus fréquemment observées comme efficaces. Des interactions écologiques favorisant l'activité biocontrôle des souches prennent probablement place dans ces conditions. Dans le temps qui nous a été imparti, il n'a pas été possible de tester les combinaisons efficaces *in planta* sur le blé. Mais cela représente une perspective de premier plan. Cette expérience devrait nous permettre de tester l'hypothèse de l'amélioration des effets protecteurs sur la plante grâce à l'expression de différents traits bénéfiques au sein du consortium. Il serait intéressant de pousser ces travaux jusqu'à leur terme car, si aujourd'hui la réglementation ne semble pas favorable à l'utilisation de consortium, car encore trop coûteuse, l'engouement actuel concernant la réduction des produits phytosanitaires chimiques pourrait la faire évoluer dans un sens favorable au développement de ce type de produit. Ceci pourrait donc permettre à l'entreprise de garder une longueur d'avance sur ce marché. Toutefois, des expériences complémentaires afin d'évaluer la survie de chaque bactérie dans l'inoculum formant le consortium *in vitro* seraient nécessaires, ainsi que des études de survie en sol en présence du blé. Pour cela, il faudrait mettre au point une méthode de suivi des différentes bactéries, soit en utilisant des marquages fluorescents ou bien en mettant au point des méthodes de quantification par q-PCR spécifique de chaque souche.

Pour déterminer si des effets de synergies existent au sein des différentes associations, il serait intéressant de poursuivre l'étude comparative des activités biologiques des surnageants des souches cultivées ensemble dans les combinaisons et de celles de surnageants reconstitués à partir de l'assemblage des surnageants de culture de chaque bactérie ayant poussé seule. Pour aller plus loin dans la compréhension et l'utilisation de ces consortia, des tests pourraient être réalisés pour étudier la capacité des consortiums à permettre une résistance à d'autres stress biotiques (d'autres pathogènes par exemple) ou bien des stress abiotiques (stress hydrique, nutritionnel...).

Découverte d'une nouvelle famille potentielle de métabolites avec une activité antifongique produits par la souche JM3. Au cours des travaux sur les 255 combinaisons, un focus a été porté sur une souche en particulier : *Bacillus amyloliquefaciens* JM3. Cette souche a présenté la particularité d'être présente dans de nombreuses combinaisons efficaces dans l'inhibition de la germination des spores. Les *Bacillus* sont connus pour produire de nombreuses molécules antimicrobiennes comme des lipopetides (Leclère et al., 2005; Leifert C. et al., 2008; Ongena and Jacques, 2008) et sont souvent utilisés pour des applications biocontrôle (Kloepper et al., 2004; Santoyo et al., 2012). Nous avons cherché à évaluer quelles molécules antifongiques cette souche de *Bacillus*, particulièrement efficace *in vitro*, était capable de produire.

Pour déterminer les raisons de son efficacité contre *Fg*, nous avons opté pour une approche comparative avec une souche taxonomiquement proche ayant une moins bonne activité biologique : *Bacillus amyloliquefaciens* AB42. Grâce à une approche de comparaison des profils métaboliques des souches JM3 et AB42, couplée à un fractionnement bioguidé, nous avons pu mettre en évidence la possible implication d'une nouvelle famille de molécules dans l'activité anti-fongique de la souche JM3: les apo-caroténoïdes. Les souches JM3 et AB42 semblent produire des molécules de la même famille qui semblent ne différer que par la présence d'hexoses. L'analyse comparative des génomes des 2 souches a révélé suggère la présence de 2 clusters de gènes (2 et 11) potentiellement impliqués dans la production de terpènes. D'autres clusters codant des voies de biosynthèse de composés antimicrobiens telles que la macrolactine, la bacillaene, la fengycine, la bacilysine, la surfactine, la difficidine-like, la balhimycine-like, la plipastatine-like et la bacillibactin sont également présents dans leurs génomes et pourraient également contribuer à l'activité de ces 2 souches.

Si les expériences pour caractériser les molécules notamment par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) confirment que les composés présents dans les fractions actives appartiennent à cette famille de molécules, il semblerait que cela soit une fonction encore inconnue à ce jour pour cette famille de molécules chez *Bacillus*. Des études sont en cours pour trouver des conditions de cultures favorables à la production de ces molécules, pour permettre une production suffisante en vue d'une caractérisation par RMN. D'après la littérature, les apo-caroténoïdes seraient produits chez *Bacillus*, lors de la formation des spores et permettraient leur protection contre les UVs (Khaneja et al., 2010; Perez-Fons et al., 2011). En élargissant la recherche du rôle antifongique des caroténoïdes à d'autres organismes producteurs et en particulier les plantes, il a été montré par exemple, la production par la tomate de lycopène (un caroténoïde acyclique), capable d'effet antifongique contre *Candida albicans* en causant des dommages sur la paroi (Sung et al., 2007). Le blé est aussi capable de produire des caroténoïdes, et cette production serait impliquée dans la résistance aux mycotoxines produites par les *Fusarium* grâce à des propriétés anti-oxydantes, mais les mécanismes ne semblent pas encore bien décrits (Boutigny et al., 2008). Une fois les différentes molécules caractérisées, il pourrait être intéressant de les comparer aux caroténoïdes et apo-caroténoïdes synthétisés par les plantes et ayant des activités antifongiques. Des structures communes pourraient être trouvées et pourraient nous permettre de faire des hypothèses sur les mécanismes d'actions des molécules produites par JM3. Si la caractérisation confirme la famille des apo-caroténoïdes, le rôle antifongique de ces molécules constituerait une première description chez *Bacillus*.

De l'agriculture intensive à l'agroécologie. A l'heure actuelle, le système de production agricole suffirait pour nourrir la population mondiale (Alexandratos and Bruinsma, 2012; Tscharncke et al., 2012). Le nombre de calories produites par l'ensemble des productions actuelles dépasse les 2700

kcal/personne/jour, ce qui est normalement suffisant pour nourrir convenablement la population mondiale (Alexandratos and Bruinsma, 2012). Toutefois, la répartition des productions est inégale d'un continent à l'autre, se traduisant par 2,5 milliards de personnes vivant avec un apport de moins de 2500 kcal/personne/jour, 500 millions avec moins de 2000kcal/personne/jour alors que 1,9 milliards vivent avec plus de 3000 kcal/personne/ jour. Environ 2 milliards de personnes sont mal nourries et environ 1 milliard de personnes souffrent de la faim, ce qui représente presque 50% de la population mondiale qui n'a pas accès à un apport journalier en ressources suffisant. Mais le système de production actuelle intensive, en particulier dans les pays développés, a conduit à une baisse non négligeable de la biodiversité des sols, en particulier par l'utilisation intensive d'intrants chimiques (pesticides et engrais), mais aussi la monoculture.

Pour ces raisons, depuis maintenant quelques années, les pays à travers le globe mettent en place des politiques visant à une agriculture plus durable. Par exemple, en France, le gouvernement a édité en 2008, le plan Ecophyto 2018, puis le plan Ecophyto 2 (http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf), visant à réduire l'utilisation des pesticides, que cela soit pour les collectivités publiques, les particuliers ou bien les professionnels. Actuellement, le marché des produits de biocontrôle semble être en pleine expansion. Toutefois, le travail à accomplir avant la mise sur le marché d'un produit, comme par exemple à partir des souches isolées au cours de cette thèse, est encore long, en particulier vis-à-vis des tests de non-toxicité du produit sur l'environnement. En effet, l'utilisation du vivant en tant qu'agent de biocontrôle n'est pas sans soulever quelques questions éthiques et en particulier sur le devenir des micro-organismes introduits dans l'environnement et de leurs effets potentiels sur des organismes non-cibles. Si les études menées sur l'impact de l'introduction de produits de biocontrôle dans un environnement ont montré, pour la plupart du temps, une résilience des communautés microbiennes (Selim et al., 2007), à nos connaissances actuelles, peu d'études ont été menées sur les conséquences d'une introduction répétée dans le temps (5, 10 ou 20 ans) sur les populations non-ciblées (micro-organismes, arthropodes, oiseaux...), et du devenir de ces micro-organismes introduits au sein des écosystèmes.

Au-delà de la recherche d'alternative à l'utilisation d'intrants chimiques, c'est tout une façon de penser l'agriculture qui semble être en changement, en particulier dans les pays développés. Alors que l'agriculture intensive est ancrée dans les esprits depuis maintenant plusieurs décennies, une nouvelle révolution agricole semble en marche, plus respectueuse de l'environnement et faisant la part belle à l'écologie. L'agroécologie a été développée par deux scientifiques, chacun ayant une manière différente de définir l'agroécologie : Altieri considère que l'agroécologie est la science de la gestion des ressources naturelles (Altieri, 1987) alors que selon Gliessmann, l'agroécologie correspond à

l'application de l'écologie à l'étude, la conception et la gestion des agrosystèmes durables (Gliessman, 1990).



Figure 3 - Principes de l'agroécologie.

Ces deux visions sont complémentaires. La démarche agroécologique est à la fois scientifique, économique et sociale (Figure 3) et doit permettre un rééquilibre entre exploitation des sols, production agricole, et biodiversité. Elle présente l'avantage d'être applicable dans n'importe quelle région du globe, contrairement à l'agriculture intensive. Grâce à l'historique de l'Agriculture, nous avons pu constater que les dérives actuelles sont venues d'une inégalité des systèmes de production entre les différents pays. L'agroécologie représente un véritable espoir pour permettre à chaque pays, en fonction de ses agro-systèmes, de nourrir sa population et ainsi de réduire la malnutrition et la famine à travers le monde. Mais la mise en place d'une telle agriculture doit s'accompagner d'une démarche, d'une sensibilisation et d'une éducation de chacun à mieux préserver les ressources à notre disposition en reconsidérant notre mode de consommation. Sans une prise de conscience individuelle et une véritable volonté de chacun d'aller vers ce changement, l'agroécologie ne restera qu'un espoir.

« Nous devons apprendre à vivre ensemble comme des frères, sinon nous allons mourir tous ensemble comme des idiots » Martin Luther King, 31 mars 1968.

Références

- Achuo, E.A., Prinsen, E., Höfte, M., 2006. Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathol.* 55, 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>
- Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G., Phillips, D.A., Nelson, L.M., 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can. J. Microbiol.* 47, 916–924. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-10-916>
- Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehrani, A., 2009. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biol. Control* 48, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.10.012>
- Akhtar, M.S., Shakeel, U., Siddiqui, Z.A., 2010. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Rhizobium Sp.* on lentil. *Turk. J. Biol.* 34, 1–7. <https://doi.org/doi:10.3906/biy-0809-12>
- Aktar, W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alexandratos, N., Bruinsma, J., 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. FAO.
- Altieri, M.A., 1987. Agroecology. The scientific basis of alternative agriculture. *Agroecol. Sci. Basis Altern. Agric.*
- Ambrose, S.H., 2001. Paleolithic technology and human evolution. *Science* 291, 1748–1753. <https://doi.org/10.1126/science.1059487>
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Factories* 8, 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Avis, T.J., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
- Bachate, S. p., Cavalca, L., Andreoni, V., 2009. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *J. Appl. Microbiol.* 107, 145–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04188.x>
- Baćmaga, M., Wyszowska, J., Kucharski, J., 2016. The effect of the Falcon 460 EC fungicide on soil microbial communities, enzyme activities and plant growth. *Ecotoxicology* 25, 1575–1587. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1713-z>
- Bai, G., Shaner, G., 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 135–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140340>
- Bairoch, P., 1989. Les trois révolutions agricoles du monde développé : rendements et productivité de 1800 à 1985. *Annales* 44, 317–353. <https://doi.org/10.3406/ahess.1989.283596>
- Baker, N.J., Bancroft, B.A., Garcia, T.S., 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Sci. Total Environ.* 449, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.056>
- Bakker, Peter A H M, Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas spp.* *Phytopathology* 97, 239–243. <https://doi.org/10.1094/PHTO-97-2-0239>
- Barzman, M., Bàrberi, P., Birch, A.N.E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., Graf, B., Hommel, B., Jensen, J.E., Kiss, J., Kudsk, P., Lamichhane, J.R., Messéan, A., Moonen, A.-C., Ratnadass, A., Ricci, P., Sarah, J.-L., Sattin, M., 2015. Eight principles of integrated pest management. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 1199–1215. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0327-9>
- Beary, T.P., Boopathy, R., Templet, P., 2002. Accelerated decomposition of sugarcane crop residue using a fungal–bacterial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50, 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00056-2)
- Bell, S., Alford, R., Garland, S., Padilla, G., Thomas, A., 2013. Screening bacterial metabolites for inhibitory effects against *Batrachochytrium dendrobatidis* using a spectrophotometric assay. *Dis. Aquat. Organ.* 103, 77–85. <https://doi.org/10.3354/dao02560>
- Ben Abdeljalil, N.O., Vallance, J., 2016. Bio-suppression of sclerotinia stem rot of tomato and biostimulation of plant growth using tomato-associated rhizobacteria. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 07. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000331>

- Benayas, J.M.R., Newton, A.C., Diaz, A., Bullock, J.M., 2009. Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis. *Science* 325, 1121–1124. <https://doi.org/10.1126/science.1172460>
- Benton, T.G., Bryant, D.M., Cole, L., Crick, H.Q.P., 2002. Linking agricultural practice to insect and bird populations: a historical study over three decades. *J. Appl. Ecol.* 39, 673–687. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2002.00745.x>
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bessey-Manzoni, Y., Rieusset, L., Joly, P., Comte, G., Prigent-Combaret, C., 2018. Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1152-2>
- Björklund, J., Limburg, K.E., Rydberg, T., 1999. Impact of production intensity on the ability of the agricultural landscape to generate ecosystem services: an example from Sweden. *Ecol. Econ.* 29, 269–291.
- Blandino, M., Minelli, L., Reyneri, A., 2006. Strategies for the chemical control of *Fusarium* head blight: Effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. *Eur. J. Agron.* 25, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.05.001>
- Bolton, M.D., Kolmer, J.A., Garvin, D.F., 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* 9, 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x>
- Boutigny, A.-L., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 411–423. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9266-x>
- Boutin, C., Strandberg, B., Carpenter, D., Mathiassen, S.K., Thomas, P.J., 2014. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? *Environ. Pollut.* 185, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.009>
- Bowles, S., Choi, J.-K., 2016. The Neolithic agricultural revolution. Santa Fe Institute Working Paper.
- Bracarense, A.-P.F.L., Lucoli, J., Grenier, B., Drociunas Pacheco, G., Moll, W.-D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *Br. J. Nutr.* 107, 1776–1786. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004946>
- Buckley, D.H., Schmidt, T.M., 2001. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.* 42, 11–21. <https://doi.org/10.1007/s00248000108>
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J. A., 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breed.* 128, 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01550.x>
- Bujold, I., Paulitz, T.C., Carisse, O., 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Dis.* 85, 977–984.
- Burkhanova, G.F., Veselova, S.V., Sorokan', A.V., Blagova, D.K., Nuzhnaya, T.V., Maksimov, I.V., 2017. Strains of *Bacillus* ssp. regulate wheat resistance to *Septoria nodorum* Berk. *Appl. Biochem. Microbiol.* 53, 346–352. <https://doi.org/10.1134/S0003683817030048>
- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J.P.W., Almond, R.E.A., Baillie, J.E.M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K.E., Carr, G.M., Chanson, J., Chenery, A.M., Csirke, J., Davidson, N.C., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., Galloway, J.N., Genovesi, P., Gregory, R.D., Hockings, M., Kapos, V., Lamarque, J.-F., Leverington, F., Loh, J., McGeoch, M.A., McRae, L., Minasyan, A., Morcillo, M.H., Oldfield, T.E.E., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J.R., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S.N., Symes, A., Tierney, M., Tyrrell, T.D., Vie, J.-C., Watson, R., 2010. Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* 328, 1164–1168. <https://doi.org/10.1126/science.1187512>
- Carson, R., 2002. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Harcourt.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M.I., Chulze, S., Etcheverry, M., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* 156, 748–754. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., Barceló, D., 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
- Chagas, F.O., Pessotti, R. de C., Caraballo-Rodríguez, A.M., Pupo, M.T., 2017. Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chem. Soc. Rev.* <https://doi.org/10.1039/c7cs00343a>

- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 1987–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
- Charmet, G., 2011. Wheat domestication: lessons for the future. *C. R. Biol.* 334, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.013>
- Chau, N.D.G., Sebesvari, Z., Amelung, W., Renaud, F.G., 2015. Pesticide pollution of multiple drinking water sources in the Mekong Delta, Vietnam: evidence from two provinces. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 9042–9058. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4034-x>
- Cheatham, M.R., Rouse, M.N., Esker, P.D., Ignacio, S., Pradel, W., Raymundo, R., Sparks, A.H., Forbes, G.A., Gordon, T.R., Garrett, K.A., 2009. Beyond yield: Plant disease in the context of ecosystem services. *Phytopathology* 99, 1228–1236.
- Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguezkabana, R., Kloepper, J.W., 1995. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Control* 5, 83–91. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1009>
- Chetouhi, C., Bonhomme, L., Lecomte, P., Cambon, F., Merlino, M., Biron, D.G., Langin, T., 2015. A proteomics survey on wheat susceptibility to *Fusarium* head blight during grain development. *Eur. J. Plant Pathol. Eur. Found. Plant Pathol.* 141, 407–418. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0552-0>
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., Prakash, A., 2008. Volatiles as priming agents that initiate plant growth and defence responses. *Curr. Sci.* 94, 595–604.
- Combes-Meynet, E., Pothier, J.F., Moëgne-Loccoz, Y., Prigent-Combaret, C., 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 271–284.
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C., Baillieul, F. 2017. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different *in vitro* tests. *Microbiol Res.* 202:11-20. doi: 10.1016/j.micres.2017.04.014.
- Conrath, U., 2009. Chapter 9 Priming of induced plant defense responses, in: *Advances in Botanical Research*, Advances in Botanical Research. Academic Press, pp. 361–395. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51009-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51009-9)
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S., Kohler, A., 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 113–119. <https://doi.org/10.1023/A:1008768516313>
- Cooper, J., Dobson, H., 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot.* 26, 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.022>
- Cronin, D., Moëgne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D.N., O’Gara, F., 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 95–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00394.x>
- Crouzet, O., Poly, F., Bonnemoy, F., Bru, D., Batisson, I., Bohatier, J., Philippot, L., Mallet, C., 2016. Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4207–4217. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4797-8>
- Cycoń, M., Wójcik, M., Borymski, S., Piotrowska-Seget, Z., 2013. Short-term effects of the herbicide napropamide on the activity and structure of the soil microbial community assessed by the multi-approach analysis. *Appl. Soil Ecol.* 66, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.01.014>
- Cycoń, M., Wójcik, M., Piotrowska-Seget, Z., 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia sp.* and *Pseudomonas sp.* and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere* 76, 494–501. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.023>
- Dal Bello, G.M., Monaco, C.I., Simon, M.R., 2002. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 627–636.
- Darine, T., Alaeddine, C., Fethi, B., Ridha, M., 2015. Fluazifop-P-butyl (herbicide) affects richness and structure of soil bacterial communities. *Soil Biol. Biochem.* 81, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.030>
- De Groot, R.S., Wilson, M.A., Boumans, R.M., 2002. A typology for the classification, description and valuation of ecosystem functions, goods and services. *Ecol. Econ.* 41, 393–408. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(02\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(02)00089-7)
- de la Peña, N.M., Butet, A., Delettre, Y., Paillat, G., Morant, P., Le Du, L., Burel, F., 2003. Response of the small mammal community to changes in western French agricultural landscapes. *Landsc. Ecol.* 18, 265–278. <https://doi.org/10.1023/A:1024452930326>

- De Vleeschauwer, D., Chernin, L., Höfte, M.M., 2009. Differential effectiveness of *Serratia plymuthica* IC1270-induced systemic resistance against hemibiotrophic and necrotrophic leaf pathogens in rice. *BMC Plant Biol.* 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-9>
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J., 1994. A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247–1250. <https://doi.org/10.1126/science.266.5188.1247>
- Delory, B.M., Delaplace, P., Fauconnier, M.-L., Jardin, P. du, 2016. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? *Plant Soil* 402, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2823-3>
- Dennis, P.G., Kukulies, T., Forstner, C., Orton, T.G., Pattison, A.B., 2018. The effects of glyphosate, glufosinate, paraquat and paraquat-diquat on soil microbial activity and bacterial, archaeal and nematode diversity. *Sci. Rep.* 8, 2119. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20589-6>
- Depuydt, S., 2014. Arguments for and against self and non-self root recognition in plants. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00614>
- Desmond, O.J., Edgar, C.I., Manners, J.M., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Kazan, K., 2005. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.12.007>
- Dill-Macky, R., Jones, R.K., 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* 84, 71–76.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F., 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* 32, 1682–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
- D’mello, J.F., Macdonald, A.M., Postel, D., Dijkma, W.T., Dujardin, A., Placinta, C.M., 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 741–751.
- Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J., 2006. Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990–2000. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.02.007>
- Dong, X., 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316–323. [https://doi.org/10.1016/1369-5266\(88\)80053-0](https://doi.org/10.1016/1369-5266(88)80053-0)
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.R., Moritz, R.F.A., Paxton, R.J., 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle: Pesticide-pathogen interactions in honey bees. *Environ. Microbiol.* 17, 969–983. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12426>
- Durrant, W.E., Dong, X., 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edwards, S.G., Godley, N., 2010. Reduction of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Addit. Contam.* 27, 629–635. <https://doi.org/10.1080/19440040903515942>
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843–7853.
- Egan, J.F., Graham, I.M., Mortensen, D.A., 2014. A comparison of the herbicide tolerances of rare and common plants in an agricultural landscape. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 696–702. <https://doi.org/10.1002/etc.2491>
- Ehi-Eromosele, C.O., Nwinyi, O.C., Ajani, O.O., 2013. Integrated pest management, in: Soloneski, S. (Ed.), *Weed and Pest Control - Conventional and New Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54476>
- El Zemrany, H., Cortet, J., Peter Lutz, M., Chabert, A., Baudoin, E., Haurat, J., Maughan, N., Félix, D., Défago, G., Bally, R., Moëne-Loccoz, Y., 2006. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1712–1726. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.025>

- Ewers, R.M., Scharlemann, J.P.W., Balmford, A., Green, R.E., 2009. Do increases in agricultural yield spare land for nature? *Glob. Change Biol.* 15, 1716–1726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01849.x>
- Eyal, Z., 1999. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 629–641.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., Avis, T.J., 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J. Chem. Ecol.* 39, 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- Falik, O., Mordoch, Y., Ben-Natan, D., Vanunu, M., Goldstein, O., Novoplansky, A., 2012. Plant responsiveness to root–root communication of stress cues. *Ann. Bot.* 110, 271–280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs045>
- Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., Giaccone, V., 2017. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>
- Fitzgibbon, C.D., 1997. Small mammals in farm woodlands: The effects of Habitat, isolation and surrounding land-use patterns. *J. Appl. Ecol.* 34, 530–539. <https://doi.org/10.2307/2404895>
- Forsyth, D.M., Yoshizawa, T., Morooka, N., Tuite, J., 1977. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 547–552.
- Fraire-Velázquez, S., Rodríguez-Guerra, R., Sánchez-Calderón, L., 2011. Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants, in: *Abiotic Stress Response in Plants-Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech.
- Frampton, G.K., Dorne, J.L.C.M., 2007. The effects on terrestrial invertebrates of reducing pesticide inputs in arable crop edges: a meta-analysis. *J. Appl. Ecol.* 44, 362–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01277.x>
- Fraune, S., Anton-Erxleben, F., Augustin, R., Franzenburg, S., Knop, M., Schröder, K., Willoweit-Ohl, D., Bosch, T.C., 2015. Bacteria–bacteria interactions within the microbiota of the ancestral metazoan *Hydra* contribute to fungal resistance. *ISME J.* 9, 1543–1556. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.239>
- Fried, G., Petit, S., Dessaint, F., Reboud, X., 2009. Arable weed decline in Northern France: Crop edges as refugia for weed conservation? *Biol. Conserv.* 142, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.09.029>
- Frost, C.J., Mescher, M.C., Carlson, J.E., De Moraes, C.M., 2008. Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle. *Plant Physiol.* 146, 818–824. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113027>
- Garbeva, P., Postma, J., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2006. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environ. Microbiol.* 8, 233–246. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00888.x>
- Gardeström, J., Ermold, M., Goedkoop, W., McKie, B.G., 2016. Disturbance history influences stressor impacts: effects of a fungicide and nutrients on microbial diversity and litter decomposition. *Freshw. Biol.* 61, 2171–2184. <https://doi.org/10.1111/fwb.12698>
- Gehring, T.M., Swihart, R.K., 2003. Body size, niche breadth, and ecologically scaled responses to habitat fragmentation: mammalian predators in an agricultural landscape. *Biol. Conserv.* 109, 283–295. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(02\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00156-8)
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W.W., Emmerson, M., Morales, M.B., Ceryngier, P., Liira, J., Tscharntke, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L.W., Dennis, C., Palmer, C., Oñate, J.J., Guerrero, I., Hawro, V., Aavik, T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, C., Goedhart, P.W., Inchausti, P., 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl. Ecol.* 11, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2009.12.001>
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Renato de Freitas, J., Seib, A.M., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00020-8)
- Gibbs, K.E., Mackey, R.L., Currie, D.J., 2009. Human land use, agriculture, pesticides and losses of imperiled species. *Divers. Distrib.* 15, 242–253. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00543.x>
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp. 35–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2
- Gliessman, S.R., 1990. Agroecology: Researching the ecological basis for sustainable agriculture, in: *Agroecology, Ecological Studies*. Springer, New York, NY, pp. 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3252-0_1
- Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004a. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5, 515–525. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x>

- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Gros, R., Jocteur Monrozier, L., Bartoli, F., Chotte, J.L., Faivre, P., 2004. Relationships between soil physico-chemical properties and microbial activity along a restoration chronosequence of alpine grasslands following ski run construction. *Appl. Soil Ecol.* 27, 7–22. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.03.004>
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S., Somers, D.J., 2012. Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* 7, e40695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040695>
- Haddad, N.M., Brudvig, L.A., Clobert, J., Davies, K.F., Gonzalez, A., Holt, R.D., Lovejoy, T.E., Sexton, J.O., Austin, M.P., Collins, C.D., Cook, W.M., Damschen, E.I., Ewers, R.M., Foster, B.L., Jenkins, C.N., King, A.J., Laurance, W.F., Levey, D.J., Margules, C.R., Melbourne, B.A., Nicholls, A.O., Orrock, J.L., Song, D.-X., Townshend, J.R., 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth’s ecosystems. *Sci. Adv.* 1, e1500052–e1500052. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052>
- Haines-Young, R., Potschin, M., 2010. The links between biodiversity, ecosystem services and human well-being. *Ecosyst. Ecol. New Synth.* 1, 110–139.
- Harms, W.B., Stortelder, A.H.F., Vos, W., 1987. Effects of intensification of agriculture on nature and landscape in the Netherlands. *Land Transform. Agric.* John Wiley Sons N. Y. N. Y. USA 357–379.
- Heier, T., Jain, S.K., Kogel, K.-H., Pons-Kühnemann, J., 2005. Influence of N-fertilization and fungicide strategies on *Fusarium* head blight severity and mycotoxin content in winter wheat. *J. Phytopathol.* 153, 551–557. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01021.x>
- Heil, M., Karban, R., 2010. Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends Ecol. Evol.* 25, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.09.010>
- Henkes, G.J., Jousset, A., Bonkowski, M., Thorpe, M.R., Scheu, S., Lanoue, A., Schurr, U., Röse, U.S.R., 2011. *Pseudomonas fluorescens* CH0 maintains carbon delivery to *Fusarium graminearum*-infected roots and prevents reduction in biomass of barley shoots through systemic interactions. *J. Exp. Bot.* err149. <https://doi.org/10.1093/jxb/err149>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M.C., 2013. Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 598–603. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.029>
- Hodge, A., 2009. Root decisions. *Plant Cell Environ.* 32, 628–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01891.x>
- Hooper, D.U., Chapin, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol. Monogr.* 75, 3–35.
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R.P., Pogson, B.J., 2016. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends Plant Sci.* 21, 792–803. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>
- Houghton, R.A., 1994. The worldwide extent of land-use change. *BioScience* 44, 305–313.
- Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T.J., Underwood, N., Vellend, M., 2008. Ecological consequences of genetic diversity: Ecological effects of genetic diversity. *Ecol. Lett.* 11, 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- Hyvönen, T., 2007. Can conversion to organic farming restore the species composition of arable weed communities? *Biol. Conserv.* 137, 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.02.021>
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux, J.-P., 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 16, 851–858. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.10.851>
- Ioos R, Belhadj A, Menez M., 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia.* 158(3):351-362.
- Jacobsen, B.J., Zidack, N.K., Larson, B.J., 2004. The role of *Bacillus* -based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology* 94, 1272–1275. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1272>
- Jacobsen, C.S., Hjelmsø, M.H., 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.003>
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>

- Jeanneret, P., Schüpbach, B., Luka, H., 2003. Quantifying the impact of landscape and habitat features on biodiversity in cultivated landscapes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98, 311–320. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00091-4)
- Jenkinson, n P., Parry, D.W., 1994. Isolation of *Fusarium* species from common broad-leaved weeds and their pathogenicity to winter wheat. *Mycol. Res.* 98, 776–780.
- Jia, H., Cho, S., Muehlbauer, G.J., 2009. Transcriptome analysis of a wheat near-isogenic line pair carrying *Fusarium* head blight-resistant and-susceptible alleles. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 22, 1366–1378.
- Jochum, C.C., Osborne, L.E., Yuen, G.Y., 2006. *Fusarium* head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3. *Biol. Control* 39, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.05.004>
- Joly, P., Bonnemoy, F., Besse-Hoggan, P., Perrière, F., Crouzet, O., Cheviron, N., Mallet, C., 2015. Responses of Limagne “clay/organic matter-rich” soil microbial communities to realistic formulated herbicide mixtures, including S-metolachlor, mesotrione, and nicosulfuron. *Water. Air. Soil Pollut.* 226, 413. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2683-0>
- Jones, R.A.C., 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Res.* 141, 113–130. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.028>
- Jones, R.K., 2000. Assessments of *Fusarium* head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Dis.* 84, 1021–1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1021>
- Jongman, R.H.G., 2002. Homogenisation and fragmentation of the European landscape: ecological consequences and solutions. *Landsc. Urban Plan., Fragmentation and Land Use Planning: Analysis and beyond?* 58, 211–221. [https://doi.org/10.1016/S0169-2046\(01\)00222-5](https://doi.org/10.1016/S0169-2046(01)00222-5)
- Joshi, P., Bhatt, A.B., 2011. Diversity and function of plant growth promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalayan region. *Int J Env. Sci* 1, 1135–1143.
- Jousset, A., Bonkowski, M., 2010. The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1647–1649. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.018>
- Kannan Vijayaragahavan, Sureendar Raman, 2008. Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion. *J. Basic Microbiol.* 49, 158–164. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800011>
- Karlsson, I., Friberg, H., Steinberg, C., Persson, P., 2014. Fungicide effects on fungal community composition in the wheat phyllosphere. *PLOS ONE* 9, e111786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111786>
- Kazan, K., Gardiner, D.M., Manners, J.M., 2012. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium* graminearum pathogenomics and host resistance. *Mol. Plant Pathol.* 13, 399–413. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x>
- Keroualin, K.M. de, 2003. Génèse et diffusion de l’agriculture en Europe: agriculteurs-chasseurs-pasteurs. Editions Errance.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.006>
- Khan, M.R., Doohan, F.M., 2009. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. *Biol. Control* 48, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.015>
- Khan, N.I., Schisler, D.A., Boehm, M.J., Slininger, P.J., Bothast, R.J., 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Fusarium* head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. *Plant Dis.* 85, 1253–1258. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1253>
- Khaneja, R., Perez-Fons, L., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Steiger, S., To, E., Sandmann, G., Dong, T. c., Ricca, E., Fraser, P. d., Cutting, S. m., 2010. Carotenoids found in *Bacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1889–1902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x>
- Kim, S.H., Kim, M.S., Lee, B.Y., Lee, P.C., 2016. Generation of structurally novel short carotenoids and study of their biological activity. *Sci. Rep.* 6, 21987. <https://doi.org/10.1038/srep21987>
- Kinnaird, M.F., Sanderson, E.W., O’Brien, T.G., Wibisono, H.T., Woolmer, G., 2003. Deforestation trends in a tropical landscape and implications for endangered large mammals. *Conserv. Biol.* 17, 245–257.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., Zhang, S., 2004. Induced qsystemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>
- Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J., Jensen, D.F., Gerhardson, B., Hökeberg, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L., Henriksen, B., 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 775–784.

- Kogel, K.-H., Langen, G., 2005a. Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell. Microbiol.* 7, 1555–1564. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00592.x>
- Kogel, K.-H., Langen, G., 2005b. Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cell. Microbiol.* 7, 1555–1564. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00592.x>
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Kozdrój, J., van Elsas, J.D., 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1405–1417. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00058-4)
- Kucharski, J., Tomkiel, M., Baćmaga, M., Borowik, A., Wyszowska, J., 2016. Enzyme activity and microorganisms diversity in soil contaminated with the Boreal 58 WG herbicide. *J. Environ. Sci. Health Part B.*
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N., 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 37–59. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2
- Kunkel, B.N., Brooks, D.M., 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 325–331. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00275-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00275-3)
- Kyselková, M., Kopecký, J., Frapolli, M., Défago, G., Ságová-Marečková, M., Grundmann, G.L., Moëgne-Loccoz, Y., 2009. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME J.* 3, 1127–1138. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.61>
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L., 2008. Ecological biochemistry: allelopathy and defense against herbivores, in: *Plant Physiological Ecology*. Springer, New York, NY, pp. 445–477. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78341-3_13
- Lanteigne, C., Gadkar, V.J., Wallon, T., Novinscak, A., Filion, M., 2012. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. *Phytopathology* 102, 967–973. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-11-0312>
- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.-S., Wathélet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4577–4584. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005>
- Leifert C., Li H., Chidburee Siripun, Hampson S., Workman Suzanne, Sigee D., Epton H.A.S., Harbour Agnes, 2008. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 97–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb02829.x>
- Leonard, K.J., Szabo, L.J., 2005. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Mol. Plant Pathol.* 6, 99–111.
- Letunic, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Levitan, L., Merwin, I., Kovach, J., 1995. Assessing the relative environmental impacts of agricultural pesticides: the quest for a holistic method. *Agric. Ecosyst. Environ.* 55, 153–168. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(95\)00622-Y](https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)00622-Y)
- Li, L., Ma, J., Li, Y., Wang, Z., Gao, T., Wang, Q., 2012. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. *Crop Prot.* 35, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.004>
- Li, X., Zhang, J.B., Song, B., Li, H.P., Xu, H.Q., Qu, B., Dang, F.J., Liao, Y.C., 2010. Resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat is associated with activation of a cytochrome P450 gene. *Phytopathology* 100, 183–191. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0183>
- Liu, Y., Pan, X., Li, J., 2015. A 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 83–93. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0259-9>
- Makandar, R., Nalam, V.J., Lee, H., Trick, H.N., Dong, Y., Shah, J., 2012. Salicylic acid regulates basal resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 431–439. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0232>
- Martin, R.A., MacLeod, J.A., Caldwell, C., 1991. Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium* species on cereal seed. *Plant Dis. USA.*
- Martínez-Toledo, M.V., Salmerón, V., Rodelas, B., Pozo, C., González-López, J., 1998. Effects of the fungicide Captan on some functional groups of soil microflora. *Appl. Soil Ecol.* 7, 245–255. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(97\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(97)00026-7)
- Matson, P.A., 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277, 504–509. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.504>

- Mauchline, T.H., Malone, J.G., 2017. Life in earth – the root microbiome to the rescue? *Curr. Opin. Microbiol., Environmental microbiology* * CRISPRcas9 37, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.005>
- Mazoyer, M., Roudart, L., 2006. A history of world agriculture: From the neolithic age to the current crisis. NYU Press.
- Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P., Raaijmakers, J.M., 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. *ISME J.* 3, 977–991. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.33>
- McKnight, U.S., Rasmussen, J.J., Kronvang, B., Binning, P.J., Bjerg, P.L., 2015. Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environ. Pollut.* 200, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.015>
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., Van Sanford, D., 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Dis.* 96, 1712–1728.
- McSpadden Gardener, B.B., 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology* 94, 1252–1258. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2004.94.11.1252>
- Medan, D., Torretta, J.P., Hodara, K., de la Fuente, E.B., Montaldo, N.H., 2011. Effects of agriculture expansion and intensification on the vertebrate and invertebrate diversity in the Pampas of Argentina. *Biodivers. Conserv.* 20, 3077–3100. <https://doi.org/10.1007/s10531-011-0118-9>
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R., 2003. The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(11):2551-65.
- Mesterhazy, A., Bartok, T., Lamper, C., 2003. Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of *Fusarium* head blight. *Plant Dis.* 87, 1107–1115. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.9.1107>
- Métraux, J.-P., Nawrath, C., Genoud, T., 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica* 124, 237–243.
- Michel, N., Burel, F., Butet, A., 2006. How does landscape use influence small mammal diversity, abundance and biomass in hedgerow networks of farming landscapes? *Acta Oecologica* 30, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2005.12.006>
- Miller, J.D., Culley, J., Fraser, K., Hubbard, S., Meloche, F., Ouellet, T., Seaman, W.L., Seifert, K.A., Turkington, K., Voldeng, H., 1998. Effect of tillage practice on *Fusarium* head blight of wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 20, 95–103. <https://doi.org/10.1080/07060669809500450>
- Milus, E.A., Parsons, C.E., 1994. Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* 78, 697–699.
- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W., 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett.* 566, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.011>
- Moussa, T.A.A., Almaghrabi, O.A., Abdel-Moneim, T.S., 2013. Biological control of the wheat root rot caused by *Fusarium graminearum* using some PGPR strains in Saudi Arabia: Biocontrol of wheat root-rot disease. *Ann. Appl. Biol.* 163, 72–81. <https://doi.org/10.1111/aab.12034>
- Mundt, C.C., 2002. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 381–410. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.011402.113723>
- Ndakidemi, B., Mtei, K., Ndakidemi, P.A., 2016. Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects. *Agric. Sci.* 07, 364–372. <https://doi.org/10.4236/as.2016.76038>
- Nettles, R., Watkins, J., Ricks, K., Boyer, M., Licht, M., Atwood, L.W., Peoples, M., Smith, R.G., Mortensen, D.A., Koide, R.T., 2016. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Appl. Soil Ecol.* 102, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.008>
- Newman, M.M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R.P., Liles, M.R., Ramsier, C., Kloepper, J.W., 2016. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci. Total Environ.* 543, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.008>
- Newmark, W.D., 1996. Insularization of Tanzanian parks and the local extinction of large mammals. *Conserv. Biol.* 10, 1549–1556. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10061549.x>
- Nganje, W.E., Johnson, D.D., Wilson, W.W., Leistritz, F.L., Bangsund, D.A., Tiapo, N.M., Gregoire, T., Lake, D., Jochum, N., Flakerud, G., Taylor, R., Gustafson, C., Editorial, C.J.F., 2001. Economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley: 1998-2000.
- Nocera, J.J., Blais, J.M., Beresford, D.V., Finity, L.K., Grooms, C., Kimpe, L.E., Kyser, K., Michelutti, N., Reudink, M.W., Smol, J.P., 2012. Historical pesticide applications coincided with an altered diet of aerially foraging insectivorous chimney swifts. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 3114–3120. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0445>

- Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D., Défago, G., 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology* 91, 873–881. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.9.873>
- Nourozian, J., Etebarian, H.R., Khodakaramian, G., others, 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin J Sci Technol* 28, 29–38.
- O'Donnell, K., Rooney, A.P., Proctor, R.H., Brown, D.W., McCormick, S.P., Ward, T.J., Frandsen, R.J.N., Lysøe, E., Rehner, S.A., Aoki, T., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Kang, S., Geiser, D.M., 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet. Biol.* 52, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- Oerke, E.-C., 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Okubara, P.A., Call, D.R., Kwak, Y., Skinner, D.Z., 2010. Induction of defense gene homologues in wheat roots during interactions with *Pseudomonas fluorescens*. *Biol. Control* 55, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.07.009>
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Orton, E.S., Deller, S., Brown, J.K.M., 2011. *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control: Pathogen profile for *M. graminicola*. *Mol. Plant Pathol.* 12, 413–424. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00688.x>
- Pal, K.K., McSpadden Gardener, B., 2006. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instr.* <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Palazzini, J.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2007. Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Prot.* 26, 1702–1710. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.004>
- Pan, D., Mionetto, A., Tiscornia, S., Bettucci, L., 2015. Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. *Mycotoxin Res.* 31, 137–143. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0224-8>
- Panzacchi, M., Linnell, J.D.C., Melis, C., Odden, M., Odden, J., Gorini, L., Andersen, R., 2010. Effect of land-use on small mammal abundance and diversity in a forest–farmland mosaic landscape in south-eastern Norway. *For. Ecol. Manag.* 259, 1536–1545. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.01.030>
- Paulitz, T.C., Zhou, T., Rankin, L., 1992. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* hydroponically grown cucumber. *Biol. Control* 2, 226–237. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(92\)90063-J](https://doi.org/10.1016/1049-9644(92)90063-J)
- Perez-Fons, L., Steiger, S., Khaneja, R., Bramley, P.M., Cutting, S.M., Sandmann, G., Fraser, P.D., 2011. Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.12.009>
- Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 84, 663–679. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Ent, S.V. der, Wees, S.C.M.V., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52–58. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01364-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01364-8)
- Pieterse, C.M., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J., Verhagen, B.W., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P.A., 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 51–61. <https://doi.org/10.1023/A:1008747926678>
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:347-375 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

- Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics* 8, 17–29.
- Pino, N., Peñuela, G., 2011. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 827–831. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.06.001>
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Jenkinson, P., 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 731–742.
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M., 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil* 340, 505–520. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8>
- Porej, D., Micacchion, M., Hetherington, T.E., 2004. Core terrestrial habitat for conservation of local populations of salamanders and wood frogs in agricultural landscapes. *Biol. Conserv.* 120, 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.03.015>
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Power, A.G., 2010. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 2959–2971. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0143>
- Pretty, J., 2008. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 447–465. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2163>
- Pretty, J., Bharucha, Z.P., 2015. Integrated pest management for sustainable intensification of agriculture in Asia and Africa. *Insects* 6, 152–182. <https://doi.org/10.3390/insects6010152>
- Prior, R., Mittelbach, M., Begerow, D., 2017. Impact of three different fungicides on fungal epi- and endophytic communities of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and broad bean (*Vicia faba*). *J. Environ. Sci. Health Part B* 52, 376–386.
- Qureshi, A.A., Purohit, H.J., 2002. Isolation of bacterial consortia for degradation of p-nitrophenol from agricultural soil. *Ann. Appl. Biol.* 140, 159–162. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00168.x>
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënne-Loccoz, Y., 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341–361. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9568-6>
- Radford, J.Q., Bennett, A.F., 2007. The relative importance of landscape properties for woodland birds in agricultural environments. *J. Appl. Ecol.* 44, 737–747. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01327.x>
- Ramegowda, V., Senthil-Kumar, M., 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J. Plant Physiol.* 176, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>
- Rawat, N., Pumphrey, M.O., Liu, S., Zhang, X., Tiwari, V.K., Ando, K., Trick, H.N., Bockus, W.W., Akhunov, E., Anderson, J.A., Gill, B.S., 2016. Wheat Fhb1 encodes a chimeric lectin with agglutinin domains and a pore-forming toxin-like domain conferring resistance to *Fusarium* head blight. *Nat. Genet.* 48, 1576–1580. <https://doi.org/10.1038/ng.3706>
- Reidsma, P., Tekelenburg, T., van den Berg, M., Alkemade, R., 2006. Impacts of land-use change on biodiversity: An assessment of agricultural biodiversity in the European Union. *Agric. Ecosyst. Environ.* 114, 86–102. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.11.026>
- Relyea, R.A., 2005. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol. Appl.* 15, 1118–1124.
- Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X., Trinsoutrot-Gattin, I., 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environ. Chem. Lett.* 12, 257–273. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0458-2>
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G., 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Russell, P.E., 2005. A century of fungicide evolution. *J. Agric. Sci.* 143, 11–25. <https://doi.org/10.1017/S0021859605004971>
- Sadfi, N., Chérif, M., Fliss, I., Boudabbous, A., Antoun, H., 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *J. Plant Pathol.* 83, 101–117.

- Sagar, S., Dwivedi, A., Yadav, S., Tripathi, M., Kaistha, S.D., 2012. Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* strain Cr11. *Chemosphere* 86, 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.031>
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., Govindappa, M., 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22, 855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Sarma, B.K., Yadav, S.K., Singh, S., Singh, H.B., 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biol. Biochem.* 87, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.001>
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.-N., Hollier, C., 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Secur.* 4, 519–537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., Migheli, Q., 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol. Plant Pathol.* 14, 323–341. <https://doi.org/10.1111/mpp.12011>
- Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P. a. H.M., Peer, R.V., 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant Soil* 129, 75–83. <https://doi.org/10.1007/BF00011693>
- Schisler, D.A., Khan, N.I., Boehm, M.J., Slininger, P.J., 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. *Plant Dis.* 86, 1350–1356. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.12.1350>
- Selim, S., Martin-Laurent, F., Rouard, N., Gianinazzi, S., van Tuinen, D., 2007. Impact of a new biopesticide produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 on the genetic structure and density of soil bacterial communities. *Pest Manag. Sci.* 63, 269–275. <https://doi.org/10.1002/ps.1335>
- Shanahan, P., O’Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., O’Gara, F., 1992a. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 353–358.
- Shanahan, P., O’Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., O’Gara, F., 1992b. Isolation of 2, 4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 353–358.
- Shao, H., Zhang, Y., 2017. Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Sci. Rep.* 7, 5521. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>
- Shi, C., Yan, P., Li, J., Wu, H., Li, Q., Guan, S., 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 1094–1105. <https://doi.org/10.3390/ijerph110101094>
- Silva, M., Hartling, L., Opps, S.B., 2005. Small mammals in agricultural landscapes of Prince Edward Island (Canada): Effects of habitat characteristics at three different spatial scales. *Biol. Conserv.* 126, 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.07.007>
- Šimek, M., Cooper, J.E., Pícek, T., Šantrůčková, H., 2000. Denitrification in arable soils in relation to their physico-chemical properties and fertilization practice. *Soil Biol. Biochem.* 32, 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00137-6)
- Simpson, D.R., Weston, G.E., Turner, J.A., Jennings, P., Nicholson, P., 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 421–431. <https://doi.org/10.1023/A:1011225817707>
- Singh, R.P., Singh, P.K., Rutkoski, J., Hodson, D.P., He, X., Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., Huerta-Espino, J., 2016. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 303–322. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095835>
- Singh, S., Singh, B., Mishra, B.K., Pandey, A.K., Nain, L., 2012. Microbes in agrowaste management for sustainable agriculture. *Microorg. Sustain. Agric. Biotechnol.* 127–151. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9_8
- Sivasakthi, S., Usharani, G., Saranraj, P., 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* : A review. *Afr. J. Agric. Res.* 9, 1265–1277. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7914>
- Smalling, K.L., Reeves, R., Muths, E., Vandever, M., Battaglin, W.A., Hladik, M.L., Pierce, C.L., 2015. Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Sci. Total Environ.* 502, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.114>

- Smyth, E. m., McCarthy, J., Nevin, R., Khan, M. r., Dow, J. m., O’Gara, F., Doohan, F. m., 2011. *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 111, 683–692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05079.x>
- Souza, M.L. de, Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D.E., Hay, A., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P., 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 178–184.
- Spain, A., 1990. Influence of environmental conditions and some soil chemical properties on the carbon and nitrogen contents of some tropical Australian rainforest soils. *Aust. J. Soil Res.* 28, 825. <https://doi.org/10.1071/SR9900825>
- Stone, W.W., Gilliom, R.J., Ryberg, K.R., 2014. Pesticides in U.S. streams and rivers: Occurrence and trends during 1992–2011. *Environ. Sci. Technol.* 48, 11025–11030. <https://doi.org/10.1021/es5025367>
- Sui, X., Kiser, P.D., von Lintig, J., Palczewski, K., 2013. Structural basis of carotenoid cleavage: from bacteria to mammals. *Arch. Biochem. Biophys.* 539. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.06.012>
- Suk, W.A., Ahanchian, H., Asante, K.A., Carpenter, D.O., Diaz-Barriga, F., Ha, E.-H., Huo, X., King, M., Ruchirawat, M., da Silva, E.R., Sly, L., Sly, P.D., Stein, R.T., van den Berg, M., Zar, H., Landrigan, P.J., 2016. Environmental pollution: An under-recognized threat to children’s health, especially in low- and middle-income countries. *Environ. Health Perspect.* 124, A41–A45. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510517>
- Sullivan, T.P., Sullivan, D.S., 2003. Vegetation management and ecosystem disturbance: impact of glyphosate herbicide on plant and animal diversity in terrestrial systems. *Environ. Rev.* 11, 37–59. <https://doi.org/10.1139/a03-005>
- Sułowicz, S., Piotrowska-Seget, Z., 2016. Response of microbial communities from an apple orchard and grassland soils to the first-time application of the fungicide tetraconazole. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.025>
- Sung, W.S., Lee, I.S., Lee, D.G., 2007. Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by lycopene in *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1797–1804.
- Takamatsu, S., 2013. Origin and evolution of the powdery mildews (Ascomycota, Erysiphales). *Mycoscience* 54, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.08.004>
- Thrall, P.H., Oakeshott, J.G., Fitt, G., Southerton, S., Burdon, J.J., Sheppard, A., Russell, R.J., Zalucki, M., Heino, M., Ford Denison, R., 2011. Evolution in agriculture: the application of evolutionary approaches to the management of biotic interactions in agro-ecosystems. *Evol. Appl.* 4, 200–215. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00179.x>
- Tilman, D., 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5995–6000. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5995>
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671.
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Katinakis, P., 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 35–44. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000010132.91241.cb>
- Trail, F., 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol.* 149, 103–110. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129684>
- Tscharntke, T., Clough, Y., Wanger, T.C., Jackson, L., Motzke, I., Perfecto, I., Vandermeer, J., Whitbread, A., 2012. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biol. Conserv.* 151, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>
- Tscharntke, T., Klein, A.M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., Thies, C., 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity – ecosystem service management. *Ecol. Lett.* 8, 857–874. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00782.x>
- Vachali, P., Bhosale, P., Bernstein, P.S., 2012. Microbial carotenoids, in: *Microbial Carotenoids From Fungi, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 41–59. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-918-1_2
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Valls, M., de Lorenzo, V., 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00618.x>

- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11, 296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(96\)01096-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(96)01096-1)
- Van Hoven, W., 1984. Tannins and digestibility in greater kudu. *Can. J. Anim. Sci.* 64, 177–178.
- Van Loon, L.C., Bakker, P., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483.
- Velusamy, P., Immanuel, J.E., Gnanamanickam, S.S., Thomashow, L., 2006. Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Can. J. Microbiol.* 52, 56–65. <https://doi.org/10.1139/w05-106>
- Verma, P., Yadav, A.N., Khannam, K.S., Kumar, S., Saxena, A.K., Suman, A., 2016. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *J. Basic Microbiol.* 56, 44–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500459>
- Vieira, M.V., Olifiers, N., Delciellos, A.C., Antunes, V.Z., Bernardo, L.R., Grelle, C.E.V., Cerqueira, R., 2009. Land use vs. fragment size and isolation as determinants of small mammal composition and richness in Atlantic Forest remnants. *Biol. Conserv.* 142, 1191–1200. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.006>
- Von Felten, A., Défago, G., Maurhofer, M., 2010. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. *J. Microbiol. Methods* 81, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.003>
- Vreysen, M.J.B., Robinson, A.S., Hendrichs, J., Kenmore, P., 2007. Area-wide integrated pest management (aw-imp): principles, practice and prospects, in: Vreysen, M.J.B., Robinson, A.S., Hendrichs, J. (Eds.), *Area-Wide Control of Insect Pests*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 3–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_1
- Walter, M.H., Floss, D.S., Strack, D., 2010. Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* 232, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1156-3>
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q., 2013. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biol. Fertil. Soils* 49, 435–446. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0739-5>
- Wang, J.-H., Ndoye, M., Zhang, J.-B., Li, H.-P., Liao, Y.-C., 2011. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins* 3, 1020–1037. <https://doi.org/10.3390/toxins3081020>
- Wang, Q., Shao, B., Shaikh, F.I., Friedt, W.-, Gottwald, S., 2017. Wheat resistances to *Fusarium* root rot and head blight are both associated with deoxynivalenol and jasmonate related gene expression. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0172-R>
- Wegulo, S.N., Baenziger, P.S., Hernandez Nopsa, J., Bockus, W.W., Hallen-Adams, H., 2015. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Prot., Ecology and management of Fusarium diseases* 73, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.025>
- Wegulo, S.N., Bockus, W.W., Nopsa, J.H., De Wolf, E.D., Eskridge, K.M., Peiris, K.H., Dowell, F.E., 2011. Effects of integrating cultivar resistance and fungicide application on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in winter wheat. *Plant Dis.* 95, 554–560.
- Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 379–407.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M., Thomashow, L.S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010>
- Wyand, R.A., Brown, J.K., 2003. Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. *Mol. Plant Pathol.* 4, 187–198.
- Xue, A.G., Chen, Y.H., Sant’anna, S.M.R., Voldeng, H.D., Fedak, G., Savard, M.E., Längle, T., Zhang, J.X., Harman, G.E., 2014. Efficacy of CLO-1 biofungicide in suppressing perithecial production by *Gibberella zeae* on crop residues. *Can. J. Plant Pathol.* 36, 161–169. <https://doi.org/10.1080/07060661.2014.881920>
- Yin, C., Hulbert, S.H., Schroeder, K.L., Mavrodi, O., Mavrodi, D., Dhingra, A., Schillinger, W.F., Paulitz, T.C., 2013. Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7428–7438. <https://doi.org/10.1128/AEM.01610-13>

- Yuen, G.Y., Schoneweis, S.D., 2007. Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Int. J. Food Microbiol., Mycotoxins from the Field to the Table* 119, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.033>
- Zanden J. L. Van, 2008. The first green revolution: the growth of production and productivity in European agriculture, 1870-1914. *Econ. Hist. Rev.* 44, 215–239. <https://doi.org/10.1111/j.1468-0289.1991.tb01840.x>
- Zhang, M., Teng, Y., Xu, Z., Wang, J., Christie, P., Luo, Y., 2016a. Cumulative effects of repeated chlorothalonil application on soil microbial activity and community in contrasting soils. *J. Soils Sediments* 16, 1754–1763. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1404-7>
- Zhang, M., Xu, Z., Teng, Y., Christie, P., Wang, J., Ren, W., Luo, Y., Li, Z., 2016b. Non-target effects of repeated chlorothalonil application on soil nitrogen cycling: The key functional gene study. *Sci. Total Environ.* 543, 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.053>
- Zhang, W., Ricketts, T.H., Kremen, C., Carney, K., Swinton, S.M., 2007. Ecosystem services and dis-services to agriculture. *Ecol. Econ.* 64, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.02.024>
- Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y.M.E., Liu, Y., 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* 9, e92486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>
- Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E., 2012. Domestication of plants in the old world: the origin and spread of domesticated plants in southwest Asia, Europe, and the Mediterranean basin. OUP Oxford.