



HAL
open science

Identification de marqueurs biochimiques de résistance des soies et des grains à la fusariose de type GER (Gibberella Ear Rot) chez le maïs

Jean-Marie Savignac

► **To cite this version:**

Jean-Marie Savignac. Identification de marqueurs biochimiques de résistance des soies et des grains à la fusariose de type GER (Gibberella Ear Rot) chez le maïs. Immunologie. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0002 . tel-04055313

HAL Id: tel-04055313

<https://theses.hal.science/tel-04055313>

Submitted on 2 Apr 2023

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie
SPÉCIALITÉ Biologie des organismes

Par Jean-Marie SAVIGNAC

**Identification de marqueurs biochimiques de résistance
des soies et des grains à la fusariose de type GER
(*Gibberella* Ear Rot) chez le maïs**

Sous la direction de : Florence FORGET
(co-directeur : Véronique Ortéga)

Soutenue le 17 Janvier 2023

Membres du jury :

M. MIGHELI, Quirico	Professeur des universités Université de Sassari	Rapporteur
M. POUPARD, Pascal	Maître de conférences Université d'Angers-Institut Agro	Rapporteur
Mme. CLUZET, Stéphanie	Professeure des universités Université de Bordeaux	Examineur
Mme. PICOT, Adeline	Maîtresse de conférences Université Brest	Examineur
M. MONGRAND, Sébastien	Directeur de recherche Université de Bordeaux	Examineur
Mme. ORTEGA, Véronique	Trait development lead corn Syngenta	Invité

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe de Syngenta Trait Development Corn pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse et m'avoir fourni tout le matériel biologique et le financement nécessaire à celle-ci.

Tout d'abord je tiens à remercier Véronique Ortéga pour m'avoir offert un poste à la suite de mon master pendant 3 ans au sein de son équipe, d'avoir fait toutes les démarches pour mettre en place le projet de thèse et d'avoir accepté que je sois le candidat choisi pour la réaliser. Merci beaucoup d'avoir cru en moi et de m'avoir poussé à vivre cette expérience qui m'aura permis de développer mes connaissances et mes capacités à ce qu'elles sont aujourd'hui. Merci aussi de m'avoir appris toutes ces connaissances sur les agents pathogènes du maïs et de m'avoir donné l'expérience nécessaire pour appréhender mes travaux à un niveau plus global que la simple expérience de laboratoire.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe de Syngenta, Anthony Soulier qui m'a accompagné à mes débuts et enseigné énormément sur les fonctionnements de la vie en entreprise et m'avoir aidé en mettant en place les premières campagnes de cultures. Merci à Pauline Pouny d'avoir repris la suite après le départ d'Anthony et d'avoir communiqué toutes les informations dont j'ai pu avoir besoin durant ces trois ans. Merci aussi à Camille Harel pour toute l'aide apportée. Enfin merci à tous les temporaires qui ont pu passer dans l'équipe durant ces six dernières années, permanents, temporaires et stagiaires pour tous ces bons moments passés, que ce soit mes trois années à plein temps sur site ou ces trois années de thèse où j'ai été bien moins présent. Merci aussi à toute l'équipe PLP pour la fourniture des plants et la stabilité génétique apportée à ceux-ci, ainsi qu'aux saisonniers avec lesquels j'ai passé un super été à travailler dans les champs !

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres du laboratoire MycSA pour leur accueil lors de ces 3 années de thèses.

Tout d'abord un grand merci à ma cheffe au laboratoire et directrice de thèse, Florence Richard-Forget, directrice d'unité, d'avoir accepté d'encadrer et de superviser magnifiquement bien ma thèse. Merci de votre confiance, de m'avoir donné une grande liberté dans la réalisation de mes recherches tout en réussissant à appliquer une pression qui m'a permis de ne jamais me laisser trop aller à l'oisiveté, même si je dois reconnaître que ces derniers mois auront été éprouvants. Merci de m'avoir montré ce qu'est un véritable chercheur et un excellent superviseur de recherches. J'espère sincèrement ne pas avoir été un cas trop compliqué à gérer.

Je remercie aussi tout particulièrement les autres étudiants en thèse au sein du laboratoire, et j'espère sincèrement que chacun de vous aura une belle carrière dans la recherche ! Un merci particulièrement grand à Valentin et Aurélie de m'avoir accompagné dans cette expérience et pour ces trois années où nous nous sommes supportés (et où surtout vous avez dû me supporter...).

Merci Valentin pour avoir été le meilleur voisin de bureau, m'avoir motivé à travailler quand cela était nécessaire et m'avoir permis de passer de superbes pauses cigarettes me permettant un peu d'échapper au stress du labo, mais aussi de m'avoir intégré dans ton groupe d'amis bordelais et de m'avoir fait redécouvrir le plaisir des jeux de cartes avec Magic.

Merci Aurélie d'avoir été présente pour nous soutenir quand le moral baissait dans le bureau, ta joie de vivre et ta résilience au boulot m'a permis de ne jamais avoir envie d'abandonner et de supporter tout le travail à réaliser en thèse. Ta bonne humeur a vraiment été l'un des moteurs de ma réussite aujourd'hui.

Merci à Antoine et Marie-Anne, même si nous n'avons finalement jamais été tous ensemble dans le même bureau comme cela a pu se faire avec Valentin et Aurélie, je suis très heureux d'avoir pu vous connaître et d'avoir passé de supers moments avec vous.

Enfin merci à Barbara Szabó pour m'avoir permis de découvrir au moins un peu ce qu'était d'enseigner mes connaissances à une autre personne, et de m'avoir qualifié de bon professeur (même si je ne pense toujours pas l'être).

Merci à tous pour ces bons moments au laboratoire et pour nos petites soirées en ville qui m'ont permis de beaucoup décompresser lors des moments compliqués.

Je remercie aussi les autres membres du laboratoire. Merci à Corinne, Marie-France et Thierry pour tous les services que vous avez pu me rendre. Je remercie les techniciennes de laboratoire Marie-Noëlle, Christine, Magalie et Nathalie pour toute l'aide apportée pour les différentes manip, leur soutien et leur gentillesse. Je remercie Nadia pour m'avoir appris énormément sur toute la partie biologie moléculaire et son aide sur cette thématique. Je remercie Anne pour sa gentillesse, même si nous n'avons finalement pas eu le temps bien faire bien connaissance et de travailler ensemble. Un grand merci à Stéphane pour toute l'aide apporté notamment pour la rédaction de cette thèse et les analyses métabolomiques. Merci à Jean-Michel, Marie et Gérard pour votre gentillesse. Merci à Laetitia pour l'aide sur la partie microbiologie et pour les bons moments à passer lors des colloques à Parme et Aussois. Merci à Vessela pour toute l'aide apportée, que ce soit pour la partie laboratoire mais aussi pour la rédaction des différents articles et de la thèse. Un grand merci à Sylvain qui m'a permis d'obtenir une grande autonomie sur la partie biochimique, m'avoir appris le fonctionnement technique des différentes machines et avoir répondu à tellement de mes « j'ai une petite question ».

Je tiens à remercier tous mes amis de grandes date depuis l'université, malgré la grande distance qui nous a séparé pendant ces trois années m'ont soutenu et m'ont permis de passer de très bons mais trop rares moments à reparler de toutes ces années passées ensemble à Toulouse, et de faire la fête me permettant d'oublier les soucis de la thèse. Vous êtes comme une seconde famille pour moi.

Merci à mes voisins que je peux appeler des amis qui m'ont soutenu, m'ont permis de me changer les idées avec nos discussions durant les promenades de nos amis à quatre pattes et merci Benjamin pour m'avoir initié à l'escalade et de me dépenser un peu physiquement lorsque le mental était déjà KO.

Je tiens à remercier Prudence, ma chérie qui m'a soutenue et qui malgré la distance m'a apporté tout son soutien. Même si cela n'a pas dû être toujours facile de me supporter tu es restée avec moi et m'a soutenu jusqu'au bout. Que dire de plus que je t'aime.

Enfin je souhaite faire mes plus grands remerciements à ma famille.

Tout d'abord à mes parents qui ont tout fait pour que je puisse poursuivre mes études et réaliser mes rêves. Qui m'ont toujours poussé à faire plus, à donner le meilleur de moi-même et à me surpasser pour être une meilleure personne dans ma vie. J'espère que vous serez fiers de la personne que je suis devenu et je veux que vous sachiez que c'est surtout grâce à vous.

Je remercie énormément ma sœur Céline et sa famille, merci de m'avoir soutenu et d'avoir toujours cru en moi. Tu es vraiment la meilleure sœur qu'il est possible d'avoir, Steeve est une personne extraordinaire d'une gentillesse incroyable et Romy est une petite fille adorable même si elle vous rend parfois la vie compliquée. Merci de m'avoir donnée une si jolie nièce et d'avoir agrandi la famille.

Je remercie énormément mon frère Benjamin. Même si on a parfois eu des différents plus jeunes tu as toujours été un modèle pour moi et m'a appris énormément de choses dans la vie et je ne t'en serais jamais assez reconnaissant. Tu es un frère exceptionnel et j'espère qu'aujourd'hui tu es fier de ton petit-frère et de ce qu'il a accompli.

Enfin un remerciement énorme pour Fillianore qui accompagne ma vie tous les jours depuis presque trois ans. Tu es ma petite fille à quatre pattes et même si tu ne liras jamais cela tu sais déjà que tu m'aimes plus que tout au monde et j'espère que malgré mes sautes d'humeur régulières dues à la pression je ne t'ai pas rendu la vie trop difficile. Merci à toi pour m'avoir accompagné tout ce temps et m'avoir permis de me changer les idées avec nos longues promenades au parc.

Maman, Papa, Ben et Céline, cette thèse vous est dédiée.

Publications scientifiques et communications

Publications :

Revue :

- Savignac, J.-M.; Atanasova, V.; Chéreau, S.; Ortéga, V.; Richard-Forget, F. Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxigenic Fungal Species. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9303.
<https://doi.org/10.3390/ijms23169303>

Publications scientifiques :

- Savignac, J.-M.; Atanasova, V.; Chéreau, S.; Ducos, C.; Gallegos, N.; Ortéga, V.; Ponts, N.; Richard-Forget, F. Carotenoids occurring in maize affect the redox homeostasis of *Fusarium graminearum* and its production of mycotoxins: new insights supporting their role in maize resistance to *Gibberella* Ear Rot. *J. Agric. Food Chem.* 2022
Soumis le 04 Octobre 2022

Communications Orales:

Poster scientifique :

- The role of lipophilic antioxidants in maize resistance against *Fusarium graminearum* and its mycotoxins.
 - 15 European Fusarium Seminar, 31 Mai 2021; En ligne
- Role of lipophilic antioxidants in maize resistance against *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol accumulation.
 - 13th conference of the World Mycotoxin Forum; 16-18 Mai 2022; Parme

Présentation Orale:

- Lipophilic antioxidants and maize resistance to *F. graminearum*.
 - Journées du réseau FUSATOX; 14 Octobre 2021

Table des matières

Avant-propos	1
Introduction générale	5
1- Le maïs	
a. Origine du maïs	5
b. Importance économique	5
c. Cycle de croissance	6
i. Phase végétative.....	6
ii. Phase reproductive et formation des grains	7
iii. Morphologie et composition du grain	8
d. Principaux ravageurs du maïs	9
i. Ravageurs non fongiques	9
ii. Agents pathogènes fongiques	10
2- La fusariose du maïs	
a. Importance de la fusariose sur les céréales	11
b. Cycle d'infection de <i>F. graminearum</i>	12
c. Les mycotoxines produites par <i>F. graminearum</i>	15
i. Les trichothécènes	15
ii. La toxicité des TCTB	17
iii. Voie de biosynthèse des TCTB	18
iv. La régulation des TCTB	21
3- Les moyens de lutte contre le GER	
a. Les facteurs de risques à GER	22
i. Facteurs climatiques	22
ii. La disponibilité de l'inoculum dans les parcelles.....	23
iii. Insectes et autres agresseurs facilitateurs	23
iv. Les co-infections par d'autres agents pathogènes	23
b. Les stratégies de contrôle du GER	24
i. Bonnes pratiques culturales	24
ii. Utilisation de fongicides	25
iii. Stratégies de biocontrôle.....	26
iv. La sélection variétale	27
4- Composante chimique de la résistance à GER	
a. Les différents niveaux de résistance à GER	28
b. Le rôle des phytohormones dans les mécanismes de défense	30
c. Les métabolites secondaires du maïs impliqués dans la résistance à GER	32
i. Diversité des profils en acides phénoliques, caroténoïdes et tocochromanols des maïs	33
ii. Contribution des métabolites secondaires du maïs aux mécanismes de défense contre <i>F. graminearum</i> et l'accumulation de DON	36
Revue scientifique - Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxicogenic Fungal Species	37
1. Introduction	37

2. Tocochromanols in Cereals	39
2.1. Tocochromanol Structure	39
2.2. Tocochromanol Biosynthesis	39
2.3. Tocochromanol Composition of Major Cereal Crops.....	42
2.4. Distribution of Tocochromanols within Cereal Kernels.....	43
2.5. Kinetics of Tocochromanol Accumulation during Maturation of Cereal Kernels	44
3. Tocochromanols as Part of the Plant Chemical Defense Arsenal against Phytopathogenic and Toxigenic Fungi	45
3.1. By Protecting Crops against Environmental Stresses, Tocochromanols Can Indirectly Affect Their Susceptibility to Fungal Pathogens	46
3.2. Tocochromanols Can Mitigate the Damage Caused by ROS Produced in Response to Infection by Toxigenic Fungal Pathogens	47
3.3. Tocochromanols Can Interfere with Fatty Acid Metabolism and Consequently with Plant Signaling Networks	48
3.4. Tocochromanols Display Antifungal and Antimycotoxin Activities	49
4. Conclusions.....	49
References	50
5- Projet de thèse	56
 Chapitre 1 : Les soies de maïs, premier rempart contre l'infection par <i>Fusarium graminearum</i>: quelles relations entre composition biochimique des soies et seuil de résistance du maïs (<i>Zea mays</i>)?	59
Chap.1 I) Choix et optimisation des méthodes pour la caractérisation biochimique des soies de maïs	61
Chap.1 II) The biochemical composition of maize silks significantly modulates the host susceptibility to <i>Fusarium graminearum</i>	64
A. Introduction	64
B. Material and methods	66
C. Results	
C.1. Bound phenolic acid composition of silks harvested in 2020 and 2021	69
C.2. Relation between bound phenolic acids and resistance to GER	70
C.3. Metabolomics analysis of polar soluble compounds occurring in maize silks	72
C.3.a Composition in polar soluble compounds of maize silks and putative identification	72
C.3.b Relations between polar soluble compounds of maize silks and resistance to GER	74
D. Discussion	79
References	83
Supplementary data	87
 Chapitre 2 : Les antioxydants lipophiles des grains de maïs (<i>Zea mays</i>) : leur composition selon les groupes hétérotiques et leur contribution à la sensibilité/résistance des maïs à <i>Fusarium graminearum</i>.	95

Chap.2 I) Optimisation des méthodes analytique pour l'étude des antioxydants lipophiles des maïs	97
Chap.2 II) Lipophilic antioxidant of mature maize kernels: their link with genetic origin of maize and their relation with resistance to <i>Fusarium graminearum</i>	100
A. Introduction	100
B. Material and methods	101
C. Results	
C.1. Carotenoid and tocopherol compositions of mature maize kernels	104
C.1.a Carotenoid content of maize kernels	104
C.1.b Tocopherol content of maize kernels	105
C.2. The lipophilic antioxidant composition is different according to the heterotic group.	107
C.3. The lipophilic antioxidant composition is different according to the genotype susceptibility to GER.	111
D. Discussion	115
References	118
Supplementary data	121
Chapitre 3 : Activité antifongique et anti-mycotoxine des antioxydants lipophiles présents dans les grains de maïs (<i>Zea mays</i>).	127
Chap.3 I) Carotenoids occurring in maize affect the redox homeostasis of <i>Fusarium graminearum</i> and its production of mycotoxins: new insights supporting their role in maize resistance to Giberella Ear Rot.....	129
Introduction	131
Material and Methods	133
Results	139
Discussion	149
References.....	155
Chap.3 II) Données complémentaires sur les antioxydants lipophiles non considérées dans l'article	159
A- Etude de l'effet antifongique et anti-mycotoxine de la lutéine, zéaxanthine, β -cryptoxanthine et du β -carotène.....	159
B- Etude de l'effet antifongique et anti-mycotoxine des principaux tocopherols des grains de maïs	164
Chap.3 III) Conclusion générale du chapitre 3.....	166
Discussion générale et perspectives	167
A- Synthèse des résultats majeurs	169
A.1. Composition biochimique des soies et résistance à la Fusariose	170
A.2. Composition des grains en antioxydants lipophiles et Résistance à la fusariose	172
B- Analyse critique et perspectives	174
B.1. Le panel de géotypes et son phénotypage	174
B.1.a Intégrer une plus grande diversité de	

génotypes, années et lieux de production	174
B.1.b Affiner le caractère résistant/sensible de génotypes	174
B.2. Validation de la structure et de l'intérêt des biomarqueurs candidats proposés par cette étude	176
B.2.a Confirmation de la structure des composés putativement identifiés	176
B.2.b Validation du rôle des métabolites candidats par approches génétiques	177
B.2.c Considérer les voies métaboliques ciblées par notre étude en interaction avec les autres voies de signalisation des mécanismes de défense	179
B.3. Approfondir la connaissance sur l'effet des métabolites candidats sur la croissance et toxinogénèse de <i>F. graminearum</i>	180
C- Conclusion générale	181
Références	182

Table des illustrations

Introduction

Figure 1. Cycle de vie du maïs.	7
Figure 2. Frise chronologique du développement des grains de maïs.	7
Figure 3: Structure du grain de maïs	8
Figure 4. Photographies de diverses maladies du maïs dues à des agents pathogènes. A, <i>Aspergillus</i> ear rot. B, Bacterial leaf blight (<i>Acidovorax avenae</i>). C, Maize dwarf mosaic virus (MDMV)	9
Figure 5. Macroconidies de <i>F. graminearum</i> x400	13
Figure 6. Cycle d'infection de <i>F. graminearum</i>	14
Figure 7. <i>Gibberella</i> ear rot. A, Symptômes sur épis avec spathes. B, Symptômes sur épis nus.	15
Figure 8. Structure des trichothécènes de type B.	16
Figure 9. Répartition des chémotypes majoritaires de <i>F. graminearum</i> à travers le monde.	17
Figure 10. Voie de biosynthèse des trichothécènes.	19
Figure 11. Structure des régions du cluster <i>Tri</i>	20
Figure 12. Schéma synthétique représentant les facteurs favorisant et les moyens de lutte contre le GER.	22
Figure 13. Photos des différents niveaux de résistance à l'infection des épis de maïs par <i>F. graminearum</i>	29
Figure 14. Schéma récapitulatif des implications des phytohormones dans la résistance à <i>F. graminearum</i>	32
Figure 15. Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes supérieures.	34
Review Figure 1. Tocochromanol structure.	39
Review Figure 2. Tocochromanol biosynthetic pathway.	40
Review Figure 3. Tocochromanol profile of major cereal crops ((a) Maize; (b) Oat; (c) Rice; (d) Barley; (e) Wheat).	43
Review Figure 4. Involvement of tocochromanols in plant response to biotic and abiotic stresses.	46

Chapitre 1

Article Figure 1. Scores plot for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis (110 samples, 12 variables for 2020 and 91 samples, 12 variables for 2021) of the phenolic acids found in maize silks. A: Score plot of 2020 samples. B: Score plot of 2021 samples.	70
Article Figure 2. Boxplots of phenolic acids in susceptible and tolerant genotypes in 2020 samples (n = 110). A: Boxplots of protocatechuic acid. B: Boxplots of benzoic acid. C: Boxplots of chlorogenic acid. D: Boxplots of caffeic and vanillic acid. E: Boxplots of para-coumaric acid. F: Boxplots of trans-ferulic acid. G: Boxplots of cis-ferulic acid. H: Boxplots of 8-5'DiFA. I: Boxplots of 5-5'DiFA. J: Boxplots of 8-O-4'DiFA. K: Boxplots of 8-5'BenDiFA. L: Boxplot of total phenolic acids.	71
Article Figure 3. Boxplots of phenolic acids in susceptible and tolerant genotypes in 2021 samples (n=91). A: Boxplots of protocatechuic acid. B: Boxplots of benzoic acid. C: Boxplots of chlorogenic acid, no data. E: Boxplots of para-coumaric acid. F: Boxplots of trans-ferulic acid. G: Boxplots of cis-ferulic acid. H: Boxplots of 8-5'DiFA. I: Boxplots of 5-5'DiFA. J: Boxplots of 8-O-4'DiFA. K: Boxplots of 8-5'BenDiFA. L: Boxplot of total phenolic acids.	72

Article Figure 4. Scores plot for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis (120 samples, 2819 variables for 2020 and 120 samples, 1789 variables in 2021) of signals found in metabolomic studies. A: Score plot of 2020 samples. B: Score plot of 2021 samples.	73
Article Figure 5. Pie chart of compounds putatively identified by Compound Discoverer and GNPS analysis.	74
Article Figure 6. Scores plot for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis (120 samples, 2819 variables for 2020 and 120 samples, 1789 variables in 2021, UV scaling) of signals found in metabolomic studies. A: Score plot of 2020 samples. B: Score plot of 2021 samples.	75
Article Figure 7. Volcanoplot of the signals detected in the methanolic silks extracts by LC/MS in 2020 and 2021. A: 2819 signals observed in 2020. B: 1789 signals observed in 2021.	76
Article Figure 8. Venn diagram representing the common signals linked with tolerance and susceptibility in our two years of observations.	76
Article Figure 9. Structures of putatively identified signals of Table 3. A: Chlorogenic acid. B: 3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene. C: Eupatilin. D: Feruloyl-hexose.	78
Article Figure 10. Boxplots of relative abundance of the 14 different representative putative compounds discriminating susceptible and tolerant genotypes in LC/MS analyses of methanolic silks extracts.	79

Chapitre 2

Figure 1. Comparatif des méthodes d'extraction des tocochromanols.	99
Figure 2. Comparatif des méthodes d'extraction des caroténoïdes.	99
Article Figure 1. A: Mean carotenoid percentages in mature maize kernels harvested in 2020 and 2021. B: Mean tocochromanol percentages in mature maize kernels harvested in 2020 and 2021.	106
Article Figure 2. Principal component analysis merging score and loading plots for carotenoids in maize kernels of 33 inbred lines colored by heterotic groups. A: Biplot made with observations of the 2020 harvest with 185 individuals and 5 variables. B: Biplot made with the observations of 2021 harvest with 91 individuals and 5 variables.	108
Article Figure 3. Boxplots of lutein and β -cryptoxanthin concentrations in the different heterotic groups. A: Lutein concentrations in 2020 samples. B: β -cryptoxanthin concentrations in 2020 samples. C: Lutein concentrations in 2021 samples. D: β -cryptoxanthin concentrations in 2021 samples.	108
Article Figure 4. Principal component analysis merging score and loading plots for tocochromanols in maize kernels of 33 inbred lines colored by heterotic groups. A: Biplot made with observations of 2020 harvest with 189 individuals and 11 variables. B: Biplot made with observations of 2021 harvest with 95 individuals and 11 variables.	109
Article Figure 5. Boxplots of tocochromanols concentrations in heterotic groups. A: γ -tocopherol, α -tocopherol, δ -tocopherol and total tocochromanols concentrations in 2020 samples. B: γ -tocopherol, α -tocopherol, δ -tocopherol and total tocochromanols concentrations in 2021 samples.	110
Article Figure 6. Principal component analysis merging score and loading plots for carotenoids in maize kernels of S1 and S3 inbred lines colored by susceptibility level. A: Biplot made with observations of 2020 harvest with 137 individuals and 5 variables. B: Biplot made with observations of 2021 harvest with 67 individuals and 5 variables.	112

Article Figure 7. Boxplots of individual carotenoids for the two years of harvest of S1 and S3 genotypes. A: Boxplots made with observation of 2020 harvest. B: Boxplots made with observations of 2021 harvest.	113
Article Figure 8. Principal component analysis merging score and loading plots for tocochromanols in maize kernels of S1 and S3 inbred lines colored by level of GER susceptibility. A: PCA made with observation of 2020 harvest with 141 individuals and 11 variables. B: PCA made with observations of 2021 harvest with 71 individuals and 11 variables.	114
Article Figure 9. Boxplots of tocochromanols for the two years of harvest of S1 and S3 genotypes. A: Boxplots of total tocopherols, total tocotrienols and total tocochromanols made with observations of 2020 harvest. B: Boxplots of total tocopherols, total tocotrienols and total tocochromanols made with observations of 2021 harvest.	114
Article Supplementary Figure S1. Boxplots of zeaxanthin and total carotenoids concentrations in the different heterotic groups. A: zeaxanthin concentrations in 2020 samples. B: total carotenoids concentrations in 2020 samples. C: zeaxanthin concentrations in 2021 samples. D: total carotenoids concentrations in 2021 samples.	124
Article Supplementary Figure S2. Boxplots of tocochromanols concentrations in heterotic groups. A β -tocopherol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol concentrations in 2020 samples. B: β -tocopherol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol concentrations in 2021 samples.	125
Article Supplementary Figure S3. Boxplots of tocochromanols for the two years of harvest of S1 and S3 genotypes. A: Boxplots of α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol made with observations of 2020 harvest. B: Boxplots of α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol, γ -tocotrienol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol made with observations of 2021 harvest.	126

Chapitre 3

Article Figure 1. Principal component analysis merging score and loading plots for carotenoids in maize kernels of 31 inbred lines.	143
Article Figure 2. Effect of maize carotenoid crude extracts on fungal growth (A) and DON + 15ADON production by <i>F. graminearum</i> (B).	145
Article Figure 3. Effect of zeaxanthin at different concentrations on fungal growth (A) and DON + 15ADON production by <i>F. graminearum</i> (B).	146
Article Figure 4. Expression level of genes in cultures supplemented with zeaxanthin 0.1 mM in 3 day-old (A) and 5 day old (B) cultures, in fold-change expression relative to control (solvent).	149
Figure 1. Effet des caroténoïdes à 0,1 mM sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de <i>F. graminearum</i> CBS 185.32.	160
Figure 2. Effet du β -carotène sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de <i>F. graminearum</i> CBS 185.32.	160
Figure 3. Modulation de l'expression de gènes cibles dans des cultures supplémentées avec 0.1 mM de lutéine, à 3 jours post-inoculation, exprimée en fold-change du niveau d'expression par rapport au contrôle.	162
Figure 4. Modulation de l'expression de gènes cibles dans des cultures supplémentées avec 0.1 mM de β -carotène, à 3 jours post-inoculation, exprimée en fold-change du niveau d'expression par rapport au contrôle.	163

Figure 5. Effet de l'α-tocophérol sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de <i>F. graminearum</i> CBS 185.32.	165
Figure 6. Effet du γ-tocophérol sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de <i>F. graminearum</i> CBS 185.32.	165
Discussion	
Figure 1. Récapitulatif des résultats de la thèse sur la résistance à <i>F. graminearum</i>	171

Table des tableaux

Introduction

Tableau 1. Tableau des utilisations de maïs grain français hors maïs humide.	6
Tableau 2. Limites maximales réglementaires pour le DON et la ZEA fixées dans le Journal officiel de l'Union Européenne par le règlement (CE) N° 1126/2007 de la commission du 28 septembre 2007.	15
Tableau 3. Protéines enzymatiques codées par les gènes Tri impliqués dans la biosynthèse des TCTB.	20
Tableau 4. Structure et abondance des acides phénoliques et des caroténoïdes dans le maïs.	35
Review Table 1. Key genes involved in tocochromanol biosynthesis in Arabidopsis thaliana and various cereal crops.	41
Review Table 2. Repartition of tocochromanols in the different parts of cereal kernels. ..	44

Chapitre 1

Tableau 1. Gradients d'éluion utilisées pour l'optimisation de la séparation des acides phénoliques.	63
Article Table 1. Notations and susceptibility of the 20 genotypes.	66
Article Table 2. Summary of maximum, minimum and average of bound phenolic acids found in silks in 2020 and 2021.	69
Article Table 3. Table of signals found in both 2020 and 2021 years of analysis and discriminant for susceptibility at p-value < 0.0005 and relative abundance fold change > 2.	77
Article Table 4. Summary of compounds linked with resistance and susceptibility highlighted in this study.	81
Article Supplementary Table 1. Average concentration of carotenoids for each genotype on the two years of observations.	87
Article Supplementary Table 2. Compounds putatively identified by Compound discoverer analysis.	88
Article Supplementary Table 3. Compounds putatively identified by GNPS analysis.	91

Chapitre 2

Article Table 1. The 33 genotypes used in this study: their heterotic group and GER susceptibility level.	102
Article Table 2. Concentrations in carotenoids and tocochromanols in mature maize kernels harvested in 2020 and 2021.	105
Article Table 3. Most significant differences in antioxidant lipophilic composition between the heterotic groups.	111
Article Supplementary Table 1. Average concentration of carotenoids for each genotype on the two years of observations.	121
Article Supplementary Table 2. Average concentration of tocopherols for each genotype on the two years of observations.	122
Article Supplementary Table 3. Average concentration of tocotrienol and total tocochromanols for each genotype on the two years of observations.	123

Chapitre 3

Article Table 1. Genes used for RNA analysis.	138
Article Table 2. Mean concentrations of carotenoids extracted from maize kernels of 31 inbred lines.	141
Article Table 3. Carotenoid characterization of maize extracts obtained from 240 g dry powder used for tests on <i>F. graminearum</i> growth and TCTB production.	144
Article Table 4. Pearson's matrix correlation coefficient between carotenoid contents vs. biomass or toxin yields by <i>F. graminearum</i>	145
Article Table 5. Kinetics of fungal growth and DON + 15ADON production by <i>F. graminearum</i> CBS 185.32 supplemented or not with zeaxanthin 0.1 mM.	147
Tableau 1. Cinétique de croissance fongique et de production de toxines (DON + 15ADON) par <i>F. graminearum</i> CBS 185.32 en présence ou non de lutéine ou de β -carotène à 0.1 mM.	161

Discussion et perspectives

Tableau 1. Liste des composés mis en évidence dans les mécanismes de résistance et de sensibilité à <i>F. graminearum</i> pendant la thèse.	170
--	-----

Table des abréviations

3-ADON :	3-acétyl-deoxynivalénol	HPODE :	Hydroperoxydes
15-ADON :	15-acétyl-deoxynivalénol	JA :	Acide Jasmonique
ABA :	Acide Abscissique	LOQ :	Limite De Quantification
AcN :	Acétonitrile	LOX :	Lipoxygénases
ANOVA :	Analyse de la Variance	MeOH :	Méthanol
BHT :	Hydroxytoluène Butylé	MS :	Spectrométrie de Masse
cDNA :	ADN Complémentaire	MS medium :	Milieu Synthétique
CMC medium :	Milieu Carboxy Methyl Cellulose	NIV:	Nivalénol
DAD :	Détecteur à Barette de Diodes	OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Economique
DNA :	Acide désoxyribonucléique	PCA :	Analyse en Composante Principale
DON :	Deoxynivalénol	PCR :	Réaction en Chaîne par Polymérase
ET :	Ethylène	PDA medium :	Milieu Potato Dextrose Agar
FA :	Acide Férulique	PUFA :	Acides Gras Polyinsaturés
FAO :	Food and Agriculture Organization	QTL :	Quantitative Trait Locus
FER :	Fusarium Ear Rot	RNA :	Acide ribonucléique
FX :	Fusarénone X	ROS :	Espèces Réactives de l'Oxygène
GER :	Gibberella Ear Rot	SA :	Acide Salicylique
GNPS :	Global Natural Products Social Molecular Networking	TCTB :	Trichothécènes de type B
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène	ZEA :	Zéaralénone
HPLC :	Chromatographie Liquide Haute Performance		

Avant-Propos

Les céréales représentent la base de l'alimentation humaine depuis des milliers d'années, apportant plus de la moitié des calories consommées par les humains. Elles ont aussi une importance primordiale pour l'alimentation animale ainsi que pour de nombreuses industries. Plus récemment, de nouveaux débouchés pour les céréales se sont développés avec, en particulier, la production de biocarburants, une des voies envisagées pour limiter l'utilisation des énergies fossiles. Le riz, le blé et le maïs sont les céréales les plus cultivées et la production mondiale de céréales a atteint les 3000 millions de tonnes en 2020.

Cependant la production agricole dont la production céréalière fait actuellement face à de nombreux challenges. Il s'agit de répondre à la demande croissante de nourriture induite par l'augmentation de la population humaine mondiale, à l'évolution des demandes et des standards des consommateurs soucieux d'une agriculture plus locale et responsable du point de vue environnemental, aux changements climatiques qui rendent plus difficile la culture de certaines céréales dans différentes régions du monde, ou encore à l'érosion des sols résultant d'une surexploitation des terres agricoles. La production céréalière doit ainsi s'adapter afin de permettre une alimentation saine, suffisante, respectueuse de l'environnement et restant pour autant accessible pour assurer une égalité sociale et économique entre les différents pays du monde.

L'objectif d'une production céréalière répondant à des critères de quantité, qualité et durabilité est aussi confronté à de nombreux aléas susceptibles d'affecter considérablement les rendements et qualité des récoltes. En effet la culture des céréales peut être affectée par différents stress abiotiques (températures extrêmes, sécheresse, salinité, limitation des nutriments) ou biotiques (virus, bactéries, champignons, insectes et autres ravageurs, plantes parasites). Parmi ces maladies biotiques, les maladies fongiques peuvent être dévastatrices, conduisant à des pertes de rendement mais aussi à la contamination des récoltes par des mycotoxines, molécules toxiques pour les Hommes et les animaux. Les espèces fongiques productrices de mycotoxines les plus préoccupantes pour les filières céréalières appartiennent aux genre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. En Europe, le risque majeur est, à l'heure d'aujourd'hui, lié aux espèces de *Fusarium* qui sont capables de produire une grande variété de mycotoxines dont les trichothécènes, fumonisines, zéaralénone enniatines et beauvéricine. *Fusarium graminearum* et sa production de déoxynivalénol est souvent considéré comme « l'ennemi numéro un ».

Les mycotoxines sont des composés particulièrement stables et ne sont pas ou peu sensibles aux procédés de transformation que subissent les céréales et se retrouvent dans les produits finis. Limiter l'exposition des consommateurs nécessite de mettre en place des stratégies de culture et de stockage

qui limitent l'infection par les champignons et la production de mycotoxines. Un des leviers le plus prometteur, de par son efficacité potentielle et sa compatibilité avec les critères de durabilité, repose sur la sélection variétale. La sélection de variétés résistantes aux champignons toxigènes dont *F. graminearum* est cependant freinée par le caractère complexe et polygénique de la résistance, la connaissance insuffisante des mécanismes de réponse des céréales aux champignons et le peu de disponibilité d'outils de phénotypage. Ce sont ces enjeux qui ont guidé la mise en œuvre de ce projet de thèse qui s'intéresse à la composante chimique de la résistance des maïs à la fusariose causée par *F. graminearum* et à la contamination en déoxynivalénol, avec, comme objectif appliqué, l'identification de nouveaux marqueurs biochimiques de résistance.

Introduction et contexte bibliographique

1- Le maïs

a. Origine du maïs

Le maïs (*Zea mays*) est une plante herbacée annuelle de la famille des Poacées originaire d'Amérique centrale. Bien que son origine ait d'abord été considérée comme étant sauvage et présente avant l'arrivée de l'Homme (Mangelsdorf *et al.* 1964), la théorie la plus plausible serait que le maïs soit dérivé de la domestication de la téosinte par l'Homme (Beadle 1981). En effet cette théorie est étayée par le fait que les cultures de maïs et de téosinte sont capables de se croiser. La domestication du maïs serait apparue au Mexique, il y a approximativement 10 000 ans, avec pour origine la téosinte annuelle tropicale *Zea mays ssp. parviglumis* (Sánchez González *et al.* 2018). Le maïs a, par la suite, été introduit dans le sud de l'Europe à la fin du XV^{ème} siècle par Christophe Colomb et s'est rapidement répandu jusqu'en Italie, et quelques décennies plus tard en Allemagne. Cependant, il ne s'est popularisé dans le nord de l'Espagne et le sud-ouest de la France que plus tard durant le XVII^{ème} siècle (Tenaillon & Charcosset 2011). Des études génétiques ont permis de démontrer que le maïs retrouvé dans le sud de l'Europe est relié aux variétés caribéennes introduites par Christophe Colomb tandis que celles retrouvées plus au nord dérivent des variétés de l'Amérique du nord et du Canada et auraient été introduites par Jacques Cartier. Une grande expansion de la culture du maïs s'est produite après la seconde guerre mondiale suite aux progrès génétiques et au développement d'hybrides plus performants qui ont fini par remplacer les variétés locales (Tenaillon & Charcosset 2011).

b. Importance économique

Selon la « Food and Agriculture Organization » (FAO), la production de maïs est en constante augmentation avec les années, ayant dépassé 1 milliard de tonnes en 2013 et ayant atteint 1,126 milliard de tonnes en 2020 ('FAOSTAT'), ce qui en fait la céréale la plus produite au monde devant le blé et le riz. Les États-Unis et la Chine sont de loin les plus gros producteurs avec des productions respectives de 297 et 172 millions de tonnes. La France est l'un des plus gros producteurs européens avec 13,4 millions de tonnes produites, devancée par l'Ukraine avec 30,2 millions de tonnes ('FAOSTAT'). Le maïs français est principalement cultivé dans la partie ouest du pays (Bretagne, Pays de la Loire et Aquitaine) sur une surface totale de 1,6 million d'hectares pour un rendement qui a atteint 110 quintaux/hectare en 2021 (Source Arvalis Institut du végétal). La culture du maïs est adaptée à des climats aussi différents que ceux des régions semi-arides d'Amérique Centrale, d'Europe de l'Est, et d'Asie du Sud-Est.

Les cultures de maïs peuvent avoir différentes utilisations. Pour les pays membres de l'OCDE, ces utilisations comprennent : le maïs ensilage, destiné à l'alimentation animale uniquement (bovins) ; le maïs grain dont la majorité (plus de 50%) est destinée à l'alimentation animale (volailles, ovins et

porcs), le maïs destiné à la production de biocarburants (30% environ) ; le maïs destiné à l'industrie pour la production de produits dérivés (amidonnerie et semoulerie) (OECD 2021). Le maïs doux est destiné à l'alimentation humaine et le maïs semence à la production de semences. Le bilan des utilisations des productions de maïs français est reporté dans le tableau 1.

Tableau 1. Tableau des utilisations de maïs grain français hors maïs humide. (source France AgriMer)

En 1000 t juillet - juin	2019/20	2020/21	2021/22	2021/22	VAR.m-1 en kt	Var. R2021/R2020 %
		Prov. Juil-22	Prév. Juin-22	Prév. Juil-22		
Production	12 038	12 796	14 326	14 391	+64	12%
Stock initial	2 118	2 057	1 768	1 768	0	-14%
Collecte	10 344	10 819	12 676	12 716	+40	18%
Importations	676	468	500	500	0	7%
Total disponible	13 137	13 343	14 944	14 984	+40	12%
Utilisations domestiques	6 765	6 871	6 529	6 509	-20	-5%
Amidonnerie	2 019	1 751	1 890	1 890	0	8%
Semoulerie	102	97	90	90	0	-7%
Alcool (y.c. biocarburant)	500	530	530	530	0	0%
FAB	2 862	3 329	2 950	2 930	-20	-12%
Autres	1 087	964	850	850	0	-12%
Exportations grains	4 177	4 570	5 716	5 727	+11	25%
Pays tiers	402	465	600	590	-10	27%
UE	3 688	4 011	5 016	5 037	+21	26%
Exportations farine et semoule	134	135	130	130	0	-3%
Total utilisé	11 077	11 575	12 375	12 366	-9	7%
Stock final	2 060	1 768	2 569	2 618	+48	48%

Dans ce travail de doctorat, nous nous sommes focalisés sur le maïs grain.

c. Cycle de croissance

i. Phase végétative

Dans les zones tempérées comme en Europe, les semis de maïs sont réalisés au début du printemps, entre les mois d'avril et de mai. Au début de juillet, la plante commence à se différencier pour produire ses organes mâles et femelles, le bourgeon terminal va devenir la panicule (inflorescence mâle), tandis que les bourgeons situés plus bas vont pour certains former les épis, qui après un certain temps produiront des soies qui sortiront du sommet des spathes (inflorescences femelles). Au moment de la sortie des soies (mi-juillet à mi-août), les panicules vont produire le pollen qui va pouvoir se déposer

et germer sur les soies avant leur sénescence qui survient quelques jours plus tard (5 à 8 jours) (Figure 1).

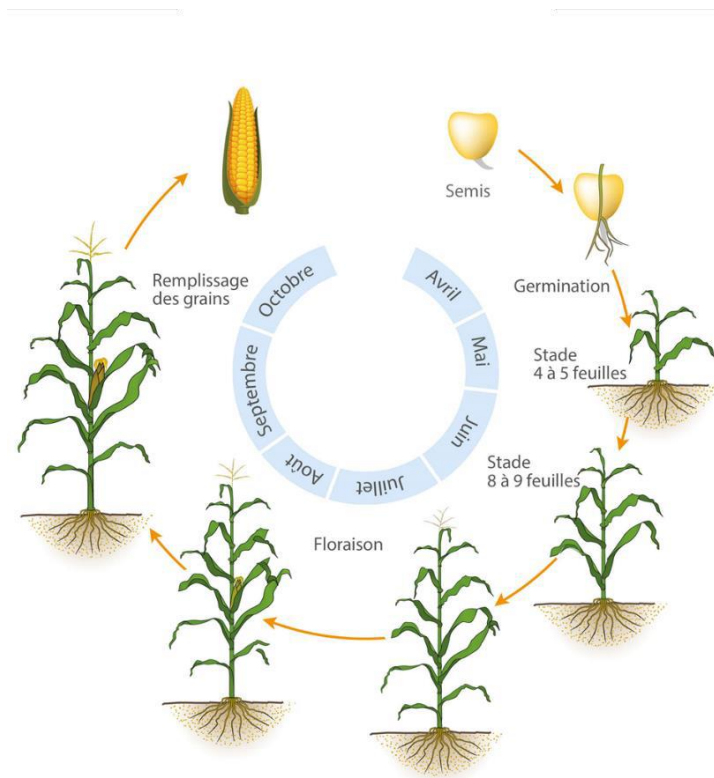


Figure 1. Cycle de vie du maïs. (Source maisculturedurable)

ii. Phase reproductive et formation des grains

Les stades de reproduction commencent après que le pollen ait germé sur les soies turgescentes jusqu'aux ovules situés sur l'épi où vont se développer les grains. Les grains vont ensuite subir des transformations lors de leur maturation qui durera environ 5 mois en moyenne (Figure 2). Les grains vont se remplir par stockage de polysaccharides (principalement sous forme d'amidon, 60 à 70%), de protéines (10%) et de lipides (3 à 18%). Après avoir atteint leur stade mature, les grains vont se

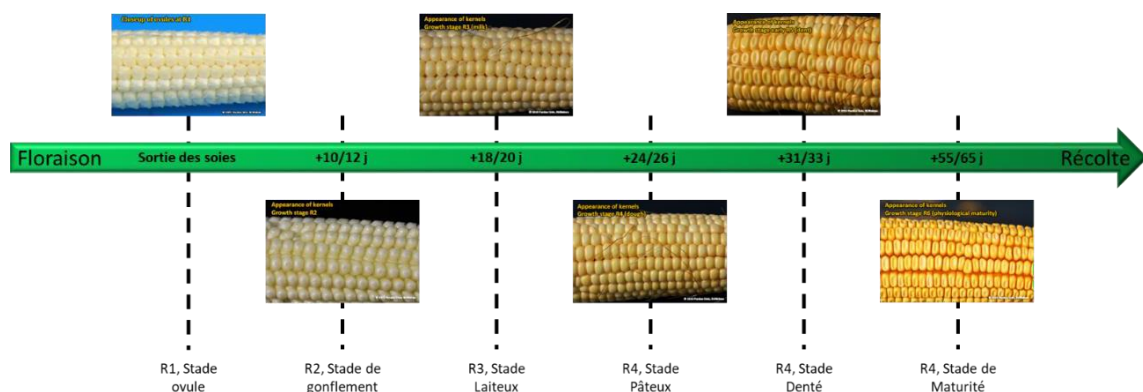


Figure 2. Frise chronologique du développement des grains de maïs. Photos de Nielsen R.L., 2013 (Grain Fill Stages in Corn (Purdue University))

déshydrater sur l'épi jusqu'à atteindre une humidité d'environ 30% et la plante va se dessécher avant la récolte qui survient généralement autour des mois d'octobre-novembre dans l'hémisphère nord.

iii. Morphologie et composition du grain

Le grain de maïs est un caryopse composé de 3 parties majeures comme décrit dans la figure 3 et ci-dessous :

- Le péricarpe qui est l'enveloppe extérieure caractérisée par une forte teneur en polysaccharides
- L'endosperme ou albumen qui sert de tissu de réserves au grain. Il est composé d'une couche à aleurone fine et de cellules contenant l'amidon. L'amidon est un polysaccharide de glucose formé de deux homopolymères, l'amylose (polyoside de glucose légèrement ramifié) et l'amylopectine (polyoside de glucose ramifié par des liaisons $\alpha(1-6)$ toutes les 24 à 30 unités).
- Le germe (ou embryon) contenant de forte teneurs en lipides, protéines et sels minéraux.

Le développement de l'endosperme qui se déroule selon deux étapes a été décrit dès 1965 (Ingle *et al.* 1965). Premièrement, les composés solubles (oses, acides aminés et nucléotides) s'accumulent et atteignent un pic de concentration à 20 jours post-pollinisation pour les oses et 28 jours pour les acides aminés et les nucléotides. Puis, jusqu'à 40 jours post-pollinisation, on observe une utilisation de ces composés solubles pour produire des protéines de réserve (glutéline, zéine). L'embryon va lui se développer de manière linéaire.

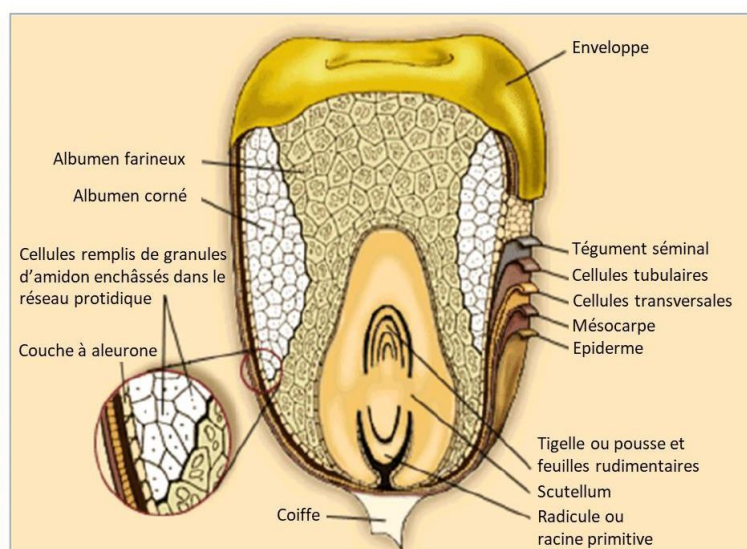


Figure 3: Structure du grain de maïs (x30) (Suleiman *et al.* 2013)

De nombreuses études se sont intéressées à la composition métabolique des grains matures de maïs, ne serait-ce que de par son importance dans l'alimentation. Ces études ont conduit à l'identification de plusieurs centaines de métabolites, principalement du métabolisme primaire tels que des sucres solubles, des acides aminés, des acides organiques ou des lipides, mais aussi du métabolisme secondaire tels que des phénylpropanoïdes, des terpènes ou encore des polyamines. La composition en métabolites secondaires sera détaillée en fin de cette partie introductive.

d. Principaux ravageurs du maïs

De nombreux agents pathogènes sont responsables de pertes significatives de rendements parmi lesquels on retrouve des ravageurs, des agents bactériens et fongiques et des virus (figure 4). Parmi ces différents agents pathogènes, les champignons sont parmi les plus préoccupants compte tenu de leur diversité et des conséquences désastreuses sur les rendements qu'ils peuvent induire.

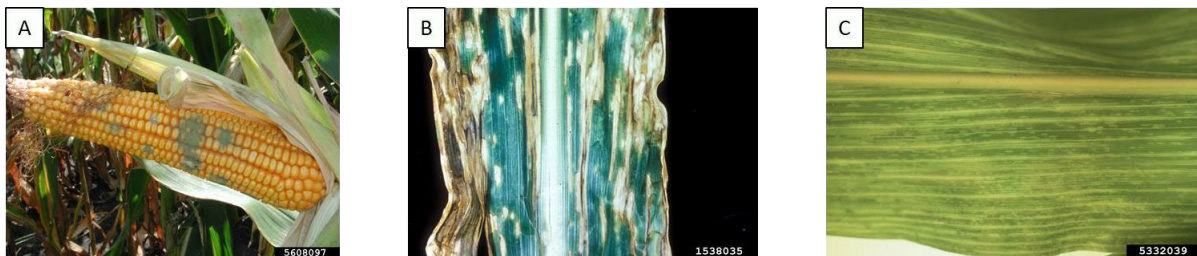


Figure 4. Photographies de diverses maladies du maïs dues à des agents pathogènes. A, *Aspergillus* ear rot, Gary Munkvold. B, Bacterial leaf blight (*Acidovorax avenae*), University of Georgia Plant Pathology. C, Maize dwarf mosaic virus (MDMV), Mary Ann Hansen, Virginia Polytechnic Institute and State University. Toutes les photos ont été obtenues sur le site forestryimages.org.

i. Ravageurs non fongiques

Parmi les ravageurs, on peut citer les nématodes qui attaquent exclusivement les racines, une diversité d'insectes qui induisent des dégâts sur les racines (taupins, chrysomèles, scutigérelles) ou les parties aériennes de la plante (pyrales, sésamies, cicadelles, pucerons, noctuelles) et sont aussi des vecteurs d'autres maladies. D'autres ravageurs tels que les oiseaux (et en particulier les corvidés) s'attaquent aux grains dès le semis. Enfin, certains mammifères (sangliers, blaireaux et les rongeurs) sont responsables de dommages importants que ce soit par consommation des grains dès le semis ou destruction des épis.

Les maladies bactériennes du maïs sont principalement des maladies foliaires telles que le flétrissement des feuilles, de la pourriture où des tâches dont les agents responsables appartiennent aux espèces bactériennes *Pseudomonas (avenae, andropogis ou syringae)*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia (dissolvens, carotovora, chrysanthemi)* ou *Clavibacter michiganensis*. Il faut aussi citer les

attaques bactériennes responsables de fontes de semis (*Bacillus subtilis*). Enfin les virus sont responsables de maladies pouvant affecter les parties aériennes de la plante (striures comme la MSV pour Maize Streak Virus ou MSFV pour Maize Fine Streak Gammanucleorhabdovirus ; nécroses par le MCMoV pour Maize Chlorotic Mottle Virus ; mosaïques par le MDMV pour Maize Dwarf Mosaic Virus ou le BMV pour Brome Mosaic Virus ; nanisme par le MRDV pour Maize Rough Dwarf Virus ou le MDMV).

ii. Agents pathogènes fongiques

L'une des causes les plus importantes des pertes de rendement du maïs est cependant associée aux pathogènes fongiques ; appartenant à une grande diversité d'espèces, ils sont aussi capables de détériorer la plante à tous les stades de son cycle de vie. On observe notamment des maladies fongiques foliaires comme l'antracnose causée par le champignon *Colletotrichum graminicola*, différentes rouilles causées par des espèces de *Puccinia*, le charbon causé par *Ustilago maydis* ou encore l'helminthosporiose (Northern Corn Leaf Blight) causée par *Exserohilum turcicum*. De plus, des maladies des racines peuvent être provoquées par des espèces de *Fusarium*, de *Phytophthora* ou de *Rhizoctonia*, des pourrissements de la tige causés par des *Fusarium* ou des *Pythium*, et enfin des maladies des épis notamment associées à des espèces fusariennes, de *Trichoderma* ou des *Aspergillus*.

Outre les pertes de rendements, certaines de ces infections sont responsables de la contamination des grains par des mycotoxines, métabolites d'origine fongique présentant une toxicité pour l'Homme et les animaux d'élevage. Parmi ces mycotoxines, certaines comme le déoxynivalénol (DON), les aflatoxines, les fumonisines ou les ochratoxines sont réglementées par la commission européenne. Des valeurs seuils à ne pas dépasser pour le maïs et produits dérivés destinés à la consommation humaine ont été fixées (CE n°1126/2007). Pour l'alimentation animale, il n'existe pas de réglementation (sauf pour les aflatoxines) mais des recommandations (CE n°2006/576). Outre ces mycotoxines soumises à réglementation, le maïs peut aussi être contaminé par des toxines non réglementées. Il s'agit en particulier des formes acétylées ou glycosylées du déoxynivalénol, des toxines T2 et HT2, des toxines dites « émergentes » (dont la beauvéricine, les enniatines et la moniliformine). Nous avons décidé dans cette thèse de nous focaliser sur le champignon *Fusarium graminearum* qui est le principal responsable de la contamination des maïs par les mycotoxines déoxynivalénol et zéaralénone.

2- La fusariose du maïs

a. Importance de la fusariose sur les céréales

La fusariose du maïs est une maladie fongique qui est due aux espèces fongiques du genre *Fusarium* et qui peut infecter toutes les parties de la plante. On retrouve ainsi la fusariose de l'épi ou « ear rot », des tiges ou « stalk rot », des plantules aussi appelée fonte de semis ou « seedling blight » et enfin des racines et des semences ou « foot rot ».

La fusariose de l'épi comprend deux types de maladies, « Fusarium Ear Rot » (FER) et « *Gibberella* Ear Rot » (GER). La fusariose de type FER, caractérisée par une pourriture de couleur rose pâle, est causée par les espèces du complexe *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* et *Fusarium subglutinans* principalement) et celles du complexe *Fusarium oxysporum*. Les espèces du *Gibberella fujikuroi* species complex sont capables de produire des mycotoxines de type fumonisines, la beauvéricine et la moniliformine. La fusariose de type GER, causée majoritairement par les champignons du complexe *sambucinum*, particulièrement *F. graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium sporotrichioides* et *Fusarium poae* se caractérise par un pourrissement de la rafle et des grains de couleur rose foncé. Ces espèces produisent différentes familles de mycotoxines, principalement des trichothécènes, de la zéaralénone et des enniatines.

Les espèces responsables des fusarioses de type GER et FER ont des caractéristiques écophysologiques très différentes : les espèces responsables de la FER se retrouvent plutôt dans des zones caractérisées par des températures élevées (Amérique du sud, Afrique et sud de l'Europe) tandis que celles responsables de la GER se retrouveront surtout en Amérique du Nord, nord de l'Europe et en Russie (Sutton *et al.* 1980).

Selon Syngenta, les pertes de rendement dues à la FER peuvent atteindre 5 à 10 quintaux par hectare ('Source Syngenta' 2017). Différentes épidémies associées à *F. graminearum* ont pu être observées au cours de l'histoire, mais peu de données sont disponibles concernant spécifiquement le maïs. Par exemple, dans les années 1990, une épidémie de fusariose survenue aux Etats Unis et Canada a provoqué la perte de près de la moitié de la récolte de blé, conduisant à une perte économique de plus de 700 millions de dollars pour la seule province du Canada de Manitoba (McMullen *et al.* 1997). Entre 1993 et 2014, aux États-Unis, les infections par *F. graminearum* ont conduit à la perte de 96 millions de tonnes de blé et ont généré une perte de 17 milliards de dollars (Wilson *et al.* 2017). Il est estimé que les contaminations du blé aux Etats Unis par *F. graminearum* conduisent chaque année à une perte proche de 28 millions de tonnes de grains, perte évaluée à 5.6 milliards de dollars US (Powell & Vujanovic 2021). L'Europe n'est pas épargnée par les épidémies de fusariose. On peut citer la Hongrie qui en 1970 a fait face à une épidémie conduisant à une diminution de 40 à 50% de sa production

suivant les régions, ou encore la Roumanie où des épidémies de fusariose survenues dans les années 1980 ont causé des diminutions de rendement allant de 40% à 70% pour certaines parcelles (Parry *et al.* 1995). En Chine, en 2012, la fusariose a affecté près de 10 millions d'hectares de blé, induisant une perte de production de plus de 2 millions de tonnes. De plus, 83,2% des échantillons de grains collectés étaient contaminés par le DON et 31,2% avaient des teneurs supérieures aux limites réglementaires (Ma *et al.* 2020). Concernant plus spécifiquement le maïs, un plan de surveillance mené en 2018 en Ontario par le ministère « Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs » en collaboration avec les associations « Grain Farmers of Ontario » et « Ontario Agri-Business » a mis en évidence que 63% des échantillons issus de champs de producteurs montraient une contamination supérieure à 500 µg/kg de DON et 19% avaient une concentration supérieure à 5 mg/kg. Une autre étude de 2020, concernant les Etats Unis et le Canada, a répertorié une perte d'environ 101 000 tonnes de maïs imputée aux fusarioses de l'épi survenues entre 2016 et 2019 (Mueller *et al.* 2020). En France, la surveillance de la qualité sanitaire des maïs est conduite par France Agrimer et Arvalis Institut du végétal. Entre 2013 et 2016, le taux annuel de non-conformité des récoltes de maïs vis-à-vis de la réglementation européenne pour le DON était compris entre 3 et 35 % selon les années.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons à la fusariose de type GER causée majoritairement par *F. graminearum* en France et nous nous concentrerons donc sur cet agent pathogène et ses interactions avec le maïs.

b. Cycle d'infection de *F. graminearum*.

F. graminearum (téléomorphe *Gibberella zeae*) est une espèce de champignon Ascomycète de la classe des Sordariomycètes. Il se caractérise par des macroconidies en forme de fuseau légèrement incurvées aux extrémités et pédicellées comprenant 3 à 7 cloisons (Figure 5).



Figure 5. Macroconidies de *F. graminearum* x400

(Photographie de Laetitia Pinson-Gadais/INRAE UR 1264 MycSA)

Comme la plupart des espèces fusariennes, ce champignon possède des phases de reproduction sexuée et asexuée. L'inoculum primaire de la maladie provient des débris de plantes infectées cultivées précédemment, sur lesquels le champignon a un comportement saprophyte. *F. graminearum* persiste dans les sols en hiver sous la forme de mycélium ou de chlamydospores (Goswami & Kistler 2004). C'est dans cette phase de son cycle de vie qu'a lieu la reproduction asexuée. Le champignon produit des spores de type macroconidie (produites dans les conidiophores) ou chlamydospores (structures de survie). Ces spores, suite à leur germination, puis par mitoses successives conduisent à un champignon haploïde qui est une copie de son géniteur. Ce mode de reproduction représente le mode d'infection majeur de *F. graminearum*. L'autre mode de reproduction, le cycle sexué, correspond à la fécondation entre deux souches de type sexué opposé. *F. graminearum* est un champignon homothallique, ce qui signifie qu'il possède les deux allèles *MAT1* nécessaires à la reproduction (Zheng *et al.* 2013). La rencontre de mycélia de sexe opposé conduit à un stade diploïde rapidement suivi par des étapes de méioses conduisant à la formation d'ascospores, qui vont elles-mêmes pouvoir germer et produire un nouveau mycélium. Les spores vont ensuite être dispersées par le vent, la pluie et parfois les insectes jusqu'aux soies de maïs qui représentent la voie d'infection primaire (Munkvold 2003; Thompson & Raizada 2018). Après avoir atteint les soies, la spore germe et le mycélium se propage le long du canal des soies jusqu'à infecter les ovules (Figure 6). Généralement ce type d'infection conduit à une progression de la maladie depuis le sommet de l'épi vers sa base de façon uniforme. Les blessures extérieures, notamment causées par des insectes, peuvent également conduire à une infection de l'épi

mais cette voie d'infection reste mineure pour *F. graminearum* (Matarese *et al.* 2012). Cette voie d'infection est associée à un développement fongique qui forme une couronne autour de l'épi et se répand vers les deux extrémités (Reid & Sinha 1998). *F. graminearum* est un champignon hémibiotrophe : cela signifie que son infection commence d'abord par une phase biotrophique (croissance intercellulaire) suivie par une phase nécrotrophique durant laquelle les hyphes pénètrent dans les cellules. Cette phase est permise par la production d'enzymes impliquées dans la dégradation des parois végétales (Walter *et al.* 2010).

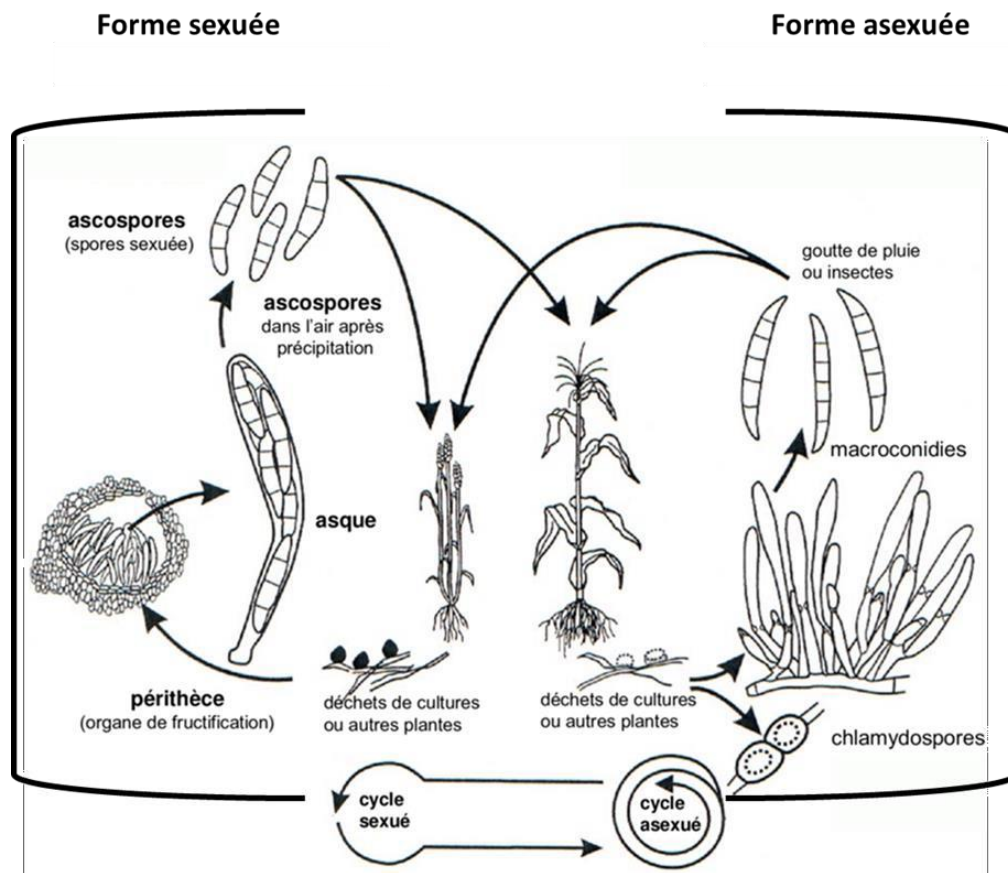


Figure 6. Cycle d'infection de *F. graminearum*. (Bily 2003)

F. graminearum est aussi capable de créer des « foot structures » similaires dans leurs fonctions à des appressoria (Boenisch & Schäfer 2011). Comme indiqué précédemment, l'infection par GER se caractérise par des symptômes de pourriture rose foncé sur les épis ; des taches de la même couleur peuvent aussi être observées sur les spathes (Figure 7).

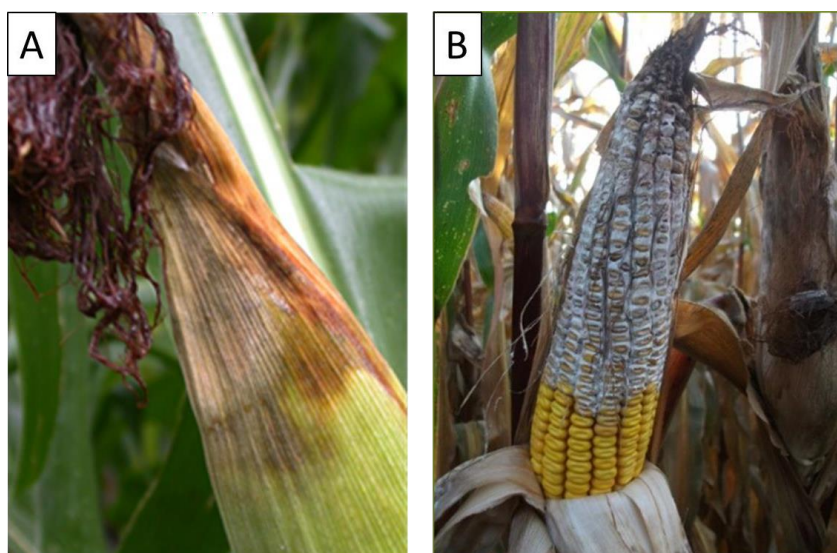


Figure 7. *Gibberella* ear rot. A, Symptômes sur épis avec spathes. B, Symptômes sur épis nus.

c. Les mycotoxines produites par *F. graminearum*

En plus des pertes significatives de rendement, les infections par *F. graminearum* sont aussi associées à une contamination des grains par des mycotoxines. Il est à noter que cette contamination peut exister même quand les grains sont d'apparence saine. Les mycotoxines produites par *F. graminearum* appartiennent à plusieurs familles dont les trichothécènes de type B, la zéaralénone et les fusarines (Perincherry *et al.* 2019), les trichothécènes de type B (TCTB) étant les plus fréquemment retrouvés dans les récoltes de maïs. Certaines de ces toxines font l'objet d'une réglementation européenne (CE n°1126/2007, tableau 2) ; les seuils fixés par cette réglementation diffèrent selon la céréale et le type de produits dérivés.

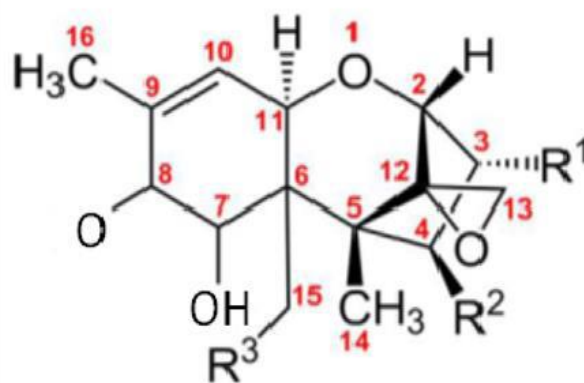
Tableau 2. Limites maximales réglementaires pour le DON et la ZEA en µg/kg fixées dans le Journal officiel de l'Union Européenne par le règlement (CE) N° 1126/2007 de la commission du 28 septembre 2007.

	Déoxynivalénol	Zéaralénone
Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	1250	100
Blé dur et avoine bruts	1750	350
Maïs brut sauf mouture humide	1750	75
Céréales destinées à la consommation humaine directe	750	400
Pâtes (sèches)	750	50
Pain, pâtisseries, biscuits, céréales de petit-déjeuner	500	100
Préparations à base de céréales pour bébés	200	20
Fractions de mouture de maïs > 500 microns	750	200
Fractions de mouture de maïs < 500 microns	1250	300

i. Les trichothécènes

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par de nombreux champignons, notamment ceux de l'ordre des Hypocréales et plus précisément par les genres *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Strachybotrys*, *Cephalosporium* ou encore *Fusarium* (McCormick *et al.* 2011). Ces mycotoxines sont des petites molécules amphipathiques qui peuvent passer passivement à travers les membranes cellulaires. Elles représentent une famille de plus de 200 toxines. Les trichothécènes sont des sesquiterpénoïdes formés d'un sesquiterpène tétracyclique avec un pont époxyde entre les carbones 12 et 13, ce pont époxyde est responsable de leur toxicité. On distingue quatre groupes de trichothécènes (A, B, C et D) (McCormick *et al.* 2011). Les trichothécènes de type B (TCTB) sont représentées par plusieurs molécules dont les structures sont représentées en figure 8. On retrouve le déoxynivalénol et ses formes acétylées (DON, 3ADON et 15ADON), le nivalénol (NIV) et sa forme acétylée la fusarénone X (FX). Une souche de *F. graminearum* est capable de ne produire qu'un couple de toxines, DON/3ADON, DON/15ADON et NIV/FX. Les souches peuvent ainsi appartenir à trois chémotypes.

En Europe et plus généralement dans les zones tempérées, le chémotype le plus communément retrouvé est DON/15ADON : la distribution des chémotypes est cependant fortement modulée par la localisation géographique (Del Ponte *et al.* 2022). Sur la figure 9 sont reportés les chémotypes majoritaires retrouvés dans les différentes régions du monde.



TCTB	R1	R2	R3
DON	OH	H	OH
15ADON	OH	H	O-CO-CH ₃
3ADON	O-CO-CH ₃	H	OH
NIV	OH	OH	OH
FX	OH	O-CO-CH ₃	OH

Figure 8. Structure des trichothécènes de type B.

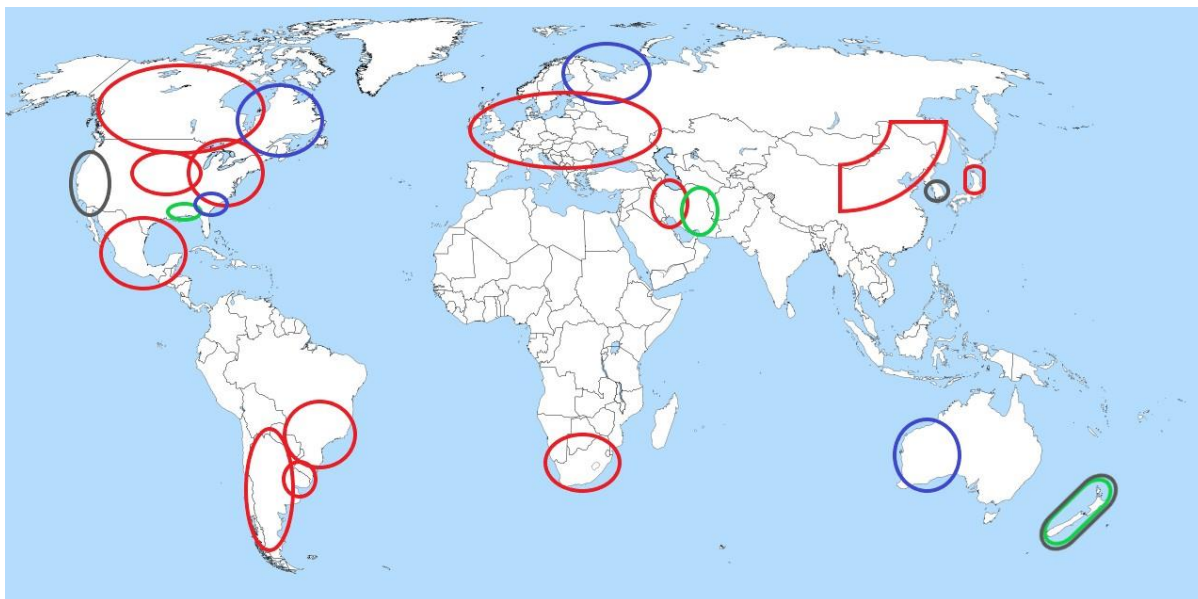


Figure 9. Répartition des chémotypes majoritaires de *F. graminearum* à travers le monde. Les zones en rouges correspondent au couple DON/15ADON, en bleu le DON/3ADON, en vert le NIV/FX et en gris les lieux avec du DON sans forme acétylée indiquée. (Scardaci & Webster 1982; Monds *et al.* 2005; Gale *et al.* 2007, 2011; Suga *et al.* 2008; Scoz *et al.* 2009; Alvarez *et al.* 2009; Yli-Mattila *et al.* 2009; Puri & Zhong 2010; Schmale *et al.* 2011; Desjardins & Proctor 2011; Astolfi *et al.* 2011; Boutigny *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012; Lee *et al.* 2012; Tan *et al.* 2012; Umpiérrez-Failache *et al.* 2013; Malbrán *et al.* 2014; van der Lee *et al.* 2015; Osman *et al.* 2016; Krnjaja *et al.* 2018)

ii. La toxicité des TCTB

Les TCTB présents dans les grains récoltés sont susceptibles de se retrouver ensuite dans les produits transformés. En effet, du fait de leurs grandes stabilités chimique et thermique, ils ne sont que très partiellement dégradés par les procédés de transformations. Cependant des méthodes de détoxification des grains post-récolte telles que l'utilisation de l'ozone ou certains procédés fermentaires peuvent présenter une certaine efficacité (Wang *et al.* 2016; Awuchi *et al.* 2021).

Les Hommes et animaux d'élevage peuvent donc être exposés aux TCTB *via* leur alimentation. Les TCTB et leur toxicité sont bien documentés chez les mammifères. Les études ont majoritairement porté sur le DON et ont démontré que son ingestion pouvait entraîner des nausées, des vomissements (d'où son appellation fréquente de vomitoxine), des troubles gastro-intestinaux (diarrhées), des pertes de poids, des fièvres et migraines ou encore des altérations du système immunitaire (Pestka 2010; Sobrova *et al.* 2010). Chez les animaux d'élevage, ces effets conduisent à une diminution des performances des élevages. Il existe néanmoins des différences de sensibilités selon les animaux, les porcs sont les plus sensibles au DON tandis que les bovins et les volailles sont moins affectés. Pour les bovins, l'origine de cette moindre sensibilité résulte pour partie de la capacité de dégradation du DON détenue par leur flore intestinale (Maul *et al.* 2012). Pour les volailles, les effets moins néfastes d'une contamination en

DON des aliments sont associés à la plus faible durée de vie des animaux dans les élevages. Le DON est absorbé à travers la paroi intestinale et est ensuite distribué par le système sanguin aux différents organes. Chez l'Homme, on distingue deux types de toxicité, la toxicité aiguë et la toxicité chronique. La toxicité aiguë survient à la suite d'une ingestion d'une importante dose de DON et se traduit par des nausées, vomissements, diarrhées, de la fièvre et des migraines voire même le décès du sujet (Sobrova *et al.* 2010). La toxicité chronique, suite à une exposition longue à des doses faibles de DON, se traduit par des maladies comme l'anorexie et/ou des maladies immunosuppressives pouvant conduire à la mort (Hou *et al.* 2021).

Les mécanismes cellulaires de la toxicité du DON reposent majoritairement sur une inhibition de la synthèse protéique par le ciblage de la sous-unité 60S du ribosome, ce qui conduit à une altération de l'élongation. Par ailleurs le DON et ses dérivés ont aussi un effet sur les mitochondries, sont inhibiteurs des synthèses d'ADN et d'ARN, affectent la mitose et interagissent avec les membranes cellulaires (Rocha *et al.* 2005). De plus, le DON et sa forme acétylée 3-ADON sont aussi capables de provoquer l'apoptose des cellules par l'activation des voies de MAP kinases (Rocha *et al.* 2005; Pestka 2010).

Chez les plantes, les TCTB induisent de la même manière que chez les animaux l'inhibition de la synthèse protéique, des synthèses d'ADN et d'ARN, des fonctions mitochondriales, de la division cellulaire et provoquent l'altération des membranes. Ainsi, les TCTB peuvent inhiber la germination, la croissance racinaire et la croissance des feuilles (Rocha *et al.* 2005). Le rôle du DON dans l'agressivité de *F. graminearum* au cours de l'infection du maïs n'est pas totalement expliqué. Pour le blé, le DON favoriserait la progression de l'agent pathogène dans les tissus en inhibant la mise en place des mécanismes de défense de la plante. Chez le maïs, l'utilisation d'une souche *F. graminearum* mutante non productrice de DON a conduit à des symptômes similaires à ceux associés à la souche sauvage (Maier *et al.* 2006). Les auteurs précédents suggèrent aussi que la NIV pourrait contribuer à l'agressivité de *F. graminearum* chez le maïs.

iii. Voies de biosynthèse des TCTB

La voie de biosynthèse des TCTB est très bien documentée (Alexander *et al.* 2009; McCormick *et al.* 2011). Elle est schématisée sur la figure 10.

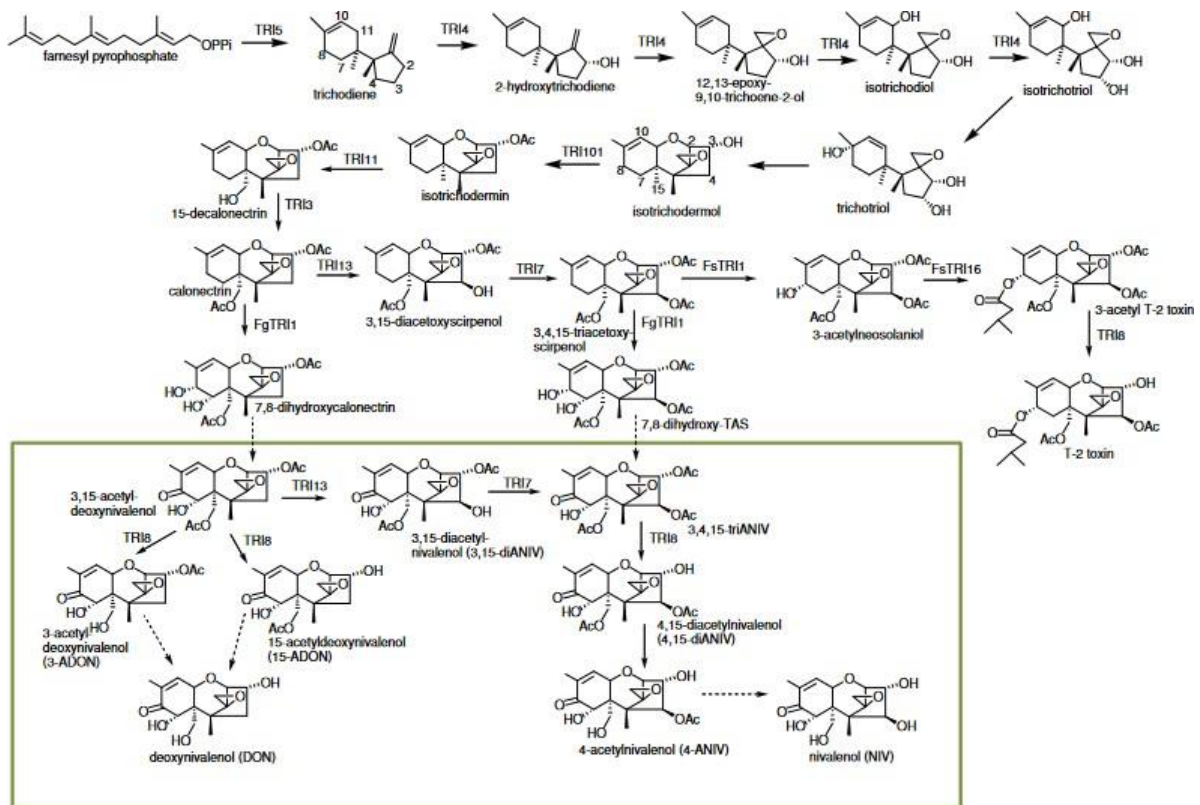


Figure 10. Voie de biosynthèse des trichothécènes. (McCormick *et al.* 2011)

La voie de biosynthèse des TCTB est associée à un ensemble de gènes appelés gènes *Tri* dont la majorité est regroupée dans le cluster *Tri* (Figure 11). Quinze gènes *Tri* ont été identifiés chez les espèces de *Fusarium* produisant la toxine T-2 (dont *F. sporotrichioides*) mais trois gènes parmi ceux-ci ont des insertions multiples les rendant non-fonctionnels chez *F. graminearum* producteur de DON (Alexander *et al.* 2009). Parmi les gènes *Tri*, on retrouve : *Tri3* codant pour une C-15 acétyltransférase ; *Tri4* pour une cytochrome P450 oxygénase, une trichodiène oxygénase catalysant une série d'oxydation ; *Tri5* pour la trichodiène synthase ; *Tri6* est un gène codant pour un facteur de transcription régulant l'expression des autres gènes du cluster ; *Tri7* code pour une C-4 acétyltransférase ; *Tri8* une C-3 ou C-15 estérase ; *Tri9* a une fonction encore inconnue ; *Tri10* est un autre gène de régulation ; *Tri11* code pour une seconde cytochrome P450 oxygénase nécessaire pour une unique étape d'hydroxylation ; *Tri12* code pour une pompe à efflux (transporteur membranaire) des trichothécènes ; *Tri13* pour la calonecitrine 4-oxygénase, une C-4 hydroxylase et enfin le gène *Tri14* a une fonction inconnue. On retrouve aussi quelques gènes hors du cluster *Tri* mais nécessaires à la biosynthèse des TCTB, *Tri1* codant pour une cytochrome P450 oxygénase ; *Tri16* une C-8 acétyltransférase et *Tri101* une 3-O-acétyltransférase (Alexander *et al.* 2009; McCormick *et al.* 2011). L'ensemble de ces gènes et de leurs fonctions sont reportés dans le tableau 3.

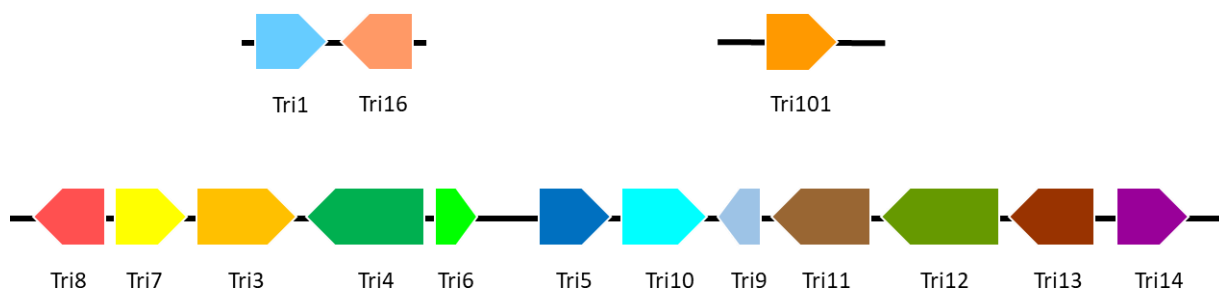


Figure 11. Structure des régions du cluster *Tri*. (D'après Alexander *et al.*, 2009)

Tableau 3. Protéines enzymatiques codées par les gènes *Tri* impliqués dans la biosynthèse des TCTB. (D'après Alexander *et al.*, 2009)

Gène	Fonction
<i>Tri8</i>	Trichothécène-3- <i>O</i> -estérase
<i>Tri7</i>	Trichothécène-4- <i>O</i> -aétyltransférase
<i>Tri3</i>	Trichothécène-15- <i>O</i> -aétyltransférase
<i>Tri4</i>	Trichodiène oxygénase
<i>Tri6</i>	Facteur de transcription
<i>Tri5</i>	Trichodiène synthase
<i>Tri10</i>	Gène de régulation
<i>Tri9</i>	Inconnue
<i>Tri11</i>	isotrichodermine 15-oxygénase
<i>Tri12</i>	Transporteur membranaire des trichothécènes
<i>Tri13</i>	calonecitrine 4-oxygénase
<i>Tri14</i>	Facteur de virulence
<i>Tri1</i>	C-8 ou C-7,8 oxygénase
<i>Tri16</i>	C-8 acétyltransférase
<i>Tri101</i>	C-3 acétyltransférase

La biosynthèse des TCTB commence par la cyclisation du farnésyl pyrophosphate, un métabolite primaire intermédiaire issu de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. Cette réaction catalysée par la trichodiène synthase conduit à la production de trichodiène. Une suite de neuf réactions va ensuite conduire à la formation de calonecitrine (McCormick *et al.* 2011). La calonecitrine est à l'origine de la formation des différentes molécules de TCTB ; c'est le métabolite carrefour conduisant à la synthèse de la toxine T2 ou à la production de DON et de ses dérivés acétylés 15ADON et 3ADON, ou à la production de la NIV et de sa forme acétylée FX.

Les produits des gènes *Tri7* et *Tri13* catalysent l'oxygénation et l'acétylation en C4 de la calonectrine qui représentent les premières étapes vers la synthèse de la NIV ; les dernières réactions étant catalysées par les enzymes codées par les gènes *Tri1* et *Tri8*. Chez les souches de chémotype DON, l'absence de gène *Tri7* et *Tri13* fonctionnels conduit à la métabolisation de la calonectrine sous l'effet de l'enzyme TRI1 et ainsi à la production du précurseur des 3ADON et 15ADON. Ensuite l'enzyme codée par *Tri8* catalyse la suppression des différents groupes acétyl pour former le 15ADON ou le 3ADON et le DON (McCormick *et al.* 2011). Les trichothécènes sont transportés au travers de la membrane plasmique par le transporteur codé par *Tri12*.

iv. La régulation des trichothécènes

La voie de biosynthèse des trichothécènes est régulée par les facteurs de transcription spécifiques TRI6 et TRI10 mais aussi par d'autres systèmes de régulations plus généraux. En effet, plusieurs stimuli externes sont capables d'influencer leur production (Merhej *et al.* 2011). Parmi ces stimuli, on retrouve notamment les sources de carbone et azote, le pH, la lumière ou encore les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Plusieurs facteurs de transcription globaux associés à ces paramètres abiotiques sont connus : FgAP1 pour la réponse au stress oxydant, FgPacC pour l'homéostasie du pH, FgAreA et FgCre1 pour les modifications de source de carbone et azote, et enfin le complexe velvet pour l'effet de la lumière. Dans les études sur le métabolisme primaire du champignon et son implication dans la production du DON, Atanasova *et al.* (Atanasova-Penichon *et al.* 2018) ont montré l'étroite imbrication de la voie de biosynthèse du DON avec le métabolisme primaire. Une relation a été mise en évidence entre les sources de carbone disponibles et leur métabolisme avec la production de DON (Jiao *et al.* 2008).

Pour le pH, il a été observé qu'une acidification du milieu entraînait une augmentation de l'expression des gènes *Tri* et en conséquence une augmentation de la production de TCTB (Gardiner *et al.* 2009; Merhej *et al.* 2011). Il a été démontré que ce processus était dû notamment au facteur de transcription FgPAC1 qui réprime l'expression des gènes *Tri* dans un milieu à pH neutre ou basique. Dans le cas de la lumière, le complexe Velvet a été identifié comme régulateur du métabolisme secondaire chez les champignons (Bayram *et al.* 2008) et plus spécifiquement de la production de DON (Jiang *et al.* 2011; Merhej *et al.* 2012). Enfin, les ROS sont aussi des régulateurs de la production de toxines. En effet, dans des cultures de *F. graminearum* supplémentées par H₂O₂ (0,5 mM), il a été observé une augmentation de la quantité de DON dans le milieu (Ponts *et al.* 2007). Cette régulation par les ROS est liée notamment au facteur de transcription *FgAP1*, qui en réponse au stress oxydatif est capable de moduler l'expression des gènes *tri* (Montibus *et al.* 2013). Un autre niveau de régulation est de plus en

plus documenté, il s'agit des mécanismes liés à la structure de la chromatine, aux événements qui conditionnent la forme euchromatine (propice à l'expression des gènes) et hétérochromatine (répression de l'expression des gènes) (Atanasoff-Kardjalieff & Studt 2022).

3- Les moyens de lutte contre GER

Les différents facteurs de risques à GER et les méthodes de lutttes sont résumés dans la figure 12.

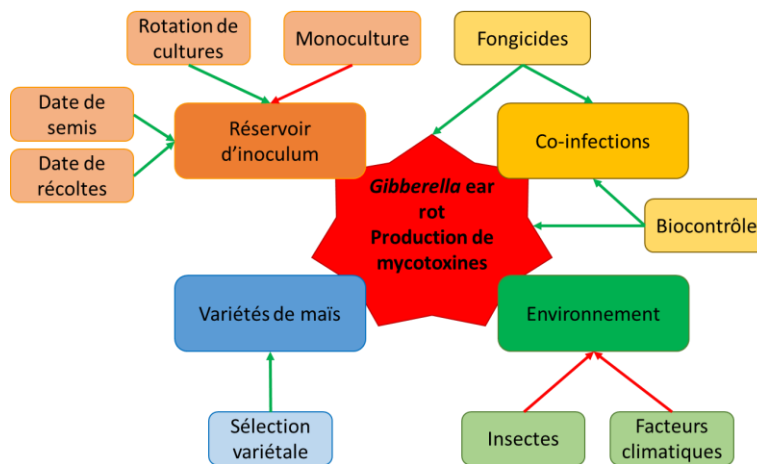


Figure 12. Schéma synthétique représentant les facteurs favorisant et les moyens de lutte contre le GER. Les flèches vertes représentent les interactions bénéfiques à la diminution des infections et des contaminations par les toxines. Les flèches rouges représentent les interactions négatives.

a. Les facteurs de risques à GER

Compte-tenu de la très grande stabilité des TCTBs, la meilleure stratégie pour limiter la contamination des aliments est de prévenir la contamination des récoltes lors de la culture. Il est donc essentiel de bien caractériser les facteurs favorisant le développement de la maladie GER au champ et d'identifier les leviers de contrôle.

i. Facteurs climatiques

Le facteur de risque majeur pour la fusariose est le facteur climatique. En effet les conditions de pluviométrie, de température et d'humidité sont déterminantes pour l'infection, la propagation de l'agent pathogène et l'accumulation de TCTB (Miller 2008). La floraison étant le stade le plus sensible pour l'infection par *F. graminearum*, des conditions pluvieuses lors de l'émergence des soies vont favoriser l'infection des maïs. De plus, compte tenu des conditions optimales de développement de *F. graminearum* (entre 25 et 28°C avec une humidité très importante ($aw = 0,97$)), des étés chauds et pluvieux sont susceptibles de conduire à des symptômes très étendus (Popovski & Celar 2013). Il a aussi été observé par Oldenburg et Schittenhelm (Oldenburg & Schittenhelm 2012) qu'un déficit

hydrique pendant la période végétative de la plante pouvait induire une plus grande contamination par le DON. Cette observation pourrait notamment s'expliquer par le stress subi par la plante qui conduit à une plus grande sensibilité de celle-ci. La relation stress abiotiques/stress biotiques liés aux agents pathogènes fongiques est discutée dans la revue reportée en fin de ce chapitre (Savignac *et al.* 2022).

ii. La disponibilité de l'inoculum dans les parcelles

Un schéma de rotation non suffisamment réfléchi et/ou un travail du sol insuffisant pour détruire les résidus de cultures contaminés favorisent la présence de réservoirs d'inoculum dans la parcelle. L'inoculum se maintient en effet dans les résidus présents dans le sol durant l'hiver et sera source d'infection pour la culture suivante. La présence de résidus de plantes hôtes de *F. graminearum* est reconnue comme un facteur majeur de risque de fusariose.

iii. Insectes et autres agresseurs facilitants

Un autre facteur susceptible d'aggraver la maladie et la contamination des récoltes par des mycotoxines est associé aux différents agresseurs du maïs. Les attaques des plantes de maïs par différents bioagresseurs peuvent conduire à un terrain favorable au champignon toxigène et faciliter son infection, sa croissance ou encore sa production de toxines. La conséquence la plus évidente des agresseurs du maïs est la détérioration de la plante et la création de portes d'entrées pour la maladie. Les insectes et les oiseaux, en se nourrissant sur la plante, vont endommager le péricarpe des grains et créer des portes d'entrée pour le champignon (Sutton *et al.* 1980; Reid *et al.* 1999).

Ces blessures vont permettre à l'agent pathogène fongique d'infecter les grains à d'autres stades de développement que celui des soies, ce qui peut exacerber le développement du GER (Munkvold 2003; Parker *et al.* 2017). Ainsi, les attaques de certains insectes ont été démontrées comme étant des facteurs augmentant la contamination par des mycotoxines. L'incidence des blessures par les insectes de la famille des lépidoptères en particulier *Striacosta albicosta* a été corrélée avec une augmentation de la quantité de DON dans les épis au Canada chez différents hybrides (Smith *et al.* 2018). De plus, les lépidoptères, en passant d'un épi à un autre, favorisent la dissémination des spores. La régulation des attaques d'insectes notamment par l'utilisation d'insecticides ou de prédateurs de ceux-ci peut s'avérer utile pour limiter les infections par *F. graminearum* (Ferrigo *et al.* 2016).

iv. Les co-infections par d'autres agents pathogènes fongiques

D'autres agresseurs peuvent aussi entraîner une augmentation de la sévérité de la maladie et de la présence de DON. C'est notamment le cas des autres pathogènes fongiques, qui lorsqu'ils entrent en compétition avec *F. graminearum* peuvent conduire à une augmentation de la production de toxines.

La co-infection de *F. graminearum* avec des espèces de la famille des *Aspergillus* et *Fusarium verticillioides* sont de loin les plus documentées. Bien que des premières études n'aient pas montré de différences significatives dans la contamination en DON lors de co-infections avec *Aspergillus parasiticus* (Etcheverry 1998), des travaux ultérieurs ont reportés un résultat opposé (Velluti *et al.* 2001). Ces données contradictoires peuvent s'expliquer par le rôle clef joué par les facteurs environnementaux dans les événements d'interactions entre espèces fongiques (Xu *et al.* 2007).

b. Les stratégies de contrôle du GER

La connaissance des facteurs susceptibles de favoriser les infections par *F. graminearum* a permis d'identifier plusieurs moyens de lutte. Ces moyens correspondent à de bonnes pratiques culturales, l'utilisation de produits chimiques ou naturels limitant la croissance du champignon ou encore la recherche et le développement de variétés résistantes aux infections (Ferrigo *et al.* 2016). Il est de plus en plus admis que seule l'utilisation combinée de ces différents leviers est susceptible de conduire à une protection optimale de la culture (Leslie *et al.* 2021).

i. Bonnes pratiques culturales

Des outils de prédiction de la sévérité de la maladie et de la teneur en mycotoxines comme le Qualimetre® de Syngenta, basés majoritairement sur des données climatiques et agronomiques et de sensibilité variétale ont été développés. Ces outils ont pour objectif de permettre aux agriculteurs d'anticiper la probable qualité des récoltes et d'adapter leur itinéraire technique en fonction du niveau de risque. Dans les données servant à leur construction, on retrouve aussi les dates de semis et de récoltes. En retardant un semis, il est possible d'éviter que la période de floraison ne se produise au moment de la production des ascospores dans la parcelle. Les périodes de récoltes doivent aussi être contrôlées afin d'éviter que la récolte n'ait lieu dans des conditions de forte humidité, ce qui pourrait favoriser la production de toxines dans les grains récoltés avant leur séchage.

La rotation des cultures et la gestion des résidus de culture sont deux pratiques pouvant réduire le risque mycotoxine sur maïs. Il a été mentionné précédemment que *F. graminearum* survivait l'hiver dans des résidus de cultures présents dans les sols et que ces résidus étaient une des premières sources d'inoculum. Par conséquent, des monocultures répétées sans labour ou broyage des résidus sont susceptibles d'augmenter les risques d'infection sur les années suivantes. Il est recommandé d'intercaler dans les schémas de rotation des cultures ne présentant pas de sensibilité à *F. graminearum* ou ne produisant que très peu de résidus comme le soja ou le colza. Ces schémas de

rotation ont comme autre avantage de permettre une meilleure régénération des sols lorsque les cultures sont alternées avec des plantes qui ne consomment que peu de ressources comme le tournesol.

Le choix des couples parcelle/variété est un autre levier d'action pour les agriculteurs. Ce choix consiste à positionner les variétés les plus résistantes dans des parcelles à risque (parcelles près de rivières, lisières de forêt qui favorisent une humidité relative de l'air plus élevée) ou des variétés d'intérêt mais sensibles dans des lieux avec peu de réservoirs d'inoculum ou connus comme étant peu propices au développement de la maladie. De même l'utilisation de variétés dites « précoces » ou « tardives » positionnées dans des environnements différents peuvent limiter la contamination par *F. graminearum*.

ii. Utilisation de fongicides

Un autre moyen de diminuer l'impact du GER sur les cultures est bien sûr l'application de fongicides. Ces fongicides doivent cependant être appliqués à un timing précis (généralement juste avant la floraison). Chez le blé par exemple, les traitements par fongicides ont une efficacité de 60 à 70% dans le meilleur des cas (Source Arvalis Institut du végétal). Parmi les principales substances utilisées chez le maïs, on retrouve le tébuconazole et le difénoconazole de la famille des triazoles, le carbendazime, le prochloraze et de nombreuses autres molécules (Gxasheka *et al.* 2021). Le mode d'action des triazoles, qui sont parmi les fongicides les plus répandus, consiste dans l'inhibition de la synthèse d'ergostérol - molécule indispensable à l'intégrité de la cellule - par interaction avec le site actif du cytochrome P450 14 α -déméthylase. L'inhibition de l'activité de cette enzyme induit une diminution de la viabilité de la souche fongique (Becher *et al.* 2011). Le prochloraze, appartenant au groupe des imidazoles, a un effet similaire à celui des triazoles. Le carbendazime pour sa part interagit avec la β -tubuline en inhibant la formation de microtubules, ce qui conduit à une inhibition de la mitose des cellules fongiques et un arrêt de la croissance fongique (Vela-Corcía *et al.* 2018).

Cependant les fongicides sont reconnus comme responsables de problèmes environnementaux et de santé et par conséquent le nombre de molécules autorisées décroît régulièrement. De plus, la surutilisation de certains de ces fongicides a induit l'apparition de souches résistantes, provoquant une sélection de ces souches résistantes dans les champs traités (et leur environnement) et un appauvrissement de l'efficacité des traitements. Des résistances aux fongicides contenant des triazoles et des benzimidazoles ont ainsi été observées chez *F. graminearum* (de Chaves *et al.* 2022). Un autre effet indirect et néfaste de l'emploi des fongicides est lié à leur large spectre d'action. Ainsi l'utilisation de fongicides peut entraîner une diminution de la flore compétitive de *F. graminearum* et conduire à

une croissance plus importante de celui-ci, comme cela a été observé avec l'utilisation de strobilurines sur blé. En limitant le développement des espèces de *Microdochium*, l'emploi d'un traitement à base de strobilurines a dans certaines conditions favorisé la production de toxines de *F. graminearum* (Bolanos-Carriel *et al.* 2020).

iii. Stratégies de Biocontrôle

Les questions environnementales et de santé publique liées à l'emploi des fongicides de synthèse, la réduction du nombre de molécules autorisées, sont à l'origine d'une recherche très active de solutions alternatives dont des méthodes de biocontrôle. Ces méthodes sont définies par l'International Biocontrol Manufacturers Association (IBMA) comme exploitant des agents actifs directement issus de la nature, ou des molécules identiques à des molécules naturelles si synthétisées. Elles reposent ainsi sur différents agents de biocontrôle dont des organismes vivants (macro ou microorganismes), des biomolécules de diverses origines, ou des molécules synthétiques parfaitement identiques à celles retrouvées dans la nature. Les agents de biocontrôle peuvent avoir différents modes d'action : ils peuvent interagir directement avec l'agent pathogène (parasitisme, métabolites antibiotiques) ou indirectement (compétition avec l'agent pathogène pour l'espace ou des nutriments, induction de la résistance chez la plante ou encore promotion de la croissance de la plante) (Legrand *et al.* 2017). Dans notre contexte, la majorité des études publiées jusqu'à aujourd'hui a concerné l'utilisation d'agents biologiques et s'est intéressée à la fusariose du blé. Contre *F. graminearum*, l'utilisation d'agents fongiques comme *Clonostachys rosea* (Palazzini *et al.* 2013) ou différents *Trichoderma* (Saravanakumar *et al.* 2017) a montré une certaine efficacité. Plusieurs caractéristiques peuvent expliquer leur activité dont : un arsenal enzymatique très riche permettant la dégradation des résidus de culture, la production de métabolites antifongiques et une capacité à induire les mécanismes de défense des plantes (Sun *et al.* 2022). Outre des résultats prometteurs vis-à-vis de la fusariose de l'épi chez le blé, l'emploi de *Trichoderma sp.* a aussi montré un intérêt pour limiter les infections des racines de maïs conduisant au Stalk rot (Saravanakumar *et al.* 2017). Plusieurs agents bactériens ont aussi été décrits comme actifs pour réduire les symptômes de la fusariose du blé et, en particulier, plusieurs isolats de *Paenibacillus polymyxa* (He *et al.* 2009), un isolat de *Streptomyces sp.* (Palazzini *et al.* 2017), un isolat de *Bacillus subtilis* (Zhao *et al.* 2014). L'emploi de certains agents bactériens pourrait aussi conduire à une diminution de la contamination en DON des grains, comme cela a été décrit récemment pour un isolat de *Bacillus subtilis* par Yu *et al.* (Yu *et al.* 2021). Enfin, il faut aussi citer la capacité de certains microorganismes à dégrader enzymatiquement certaines mycotoxines, ce qui leur confère un intérêt tout particulier pour des procédés fermentaires de détoxification ou pour des additifs en alimentation

animale. Ainsi, la revue de Zhu *et al.* (Zhu *et al.* 2016) décrit la détoxification du DON par l'espèce fongique *Sphaerodes mycoparasitica* ou des bactéries du genre *Bacillus*.

Peu de solutions de biocontrôle spécifiques de la fusariose des épis de maïs sont présentes sur le marché. On peut trouver pour l'ensemble des grandes cultures le Mycostop® à base d'isolats de la famille des *Streptomyces* produit par ICL Specialty Fertilizers et le Rhapsody® produit par Bayer à base de *Bacillus subtilis*. Le Thiovit Jet Microbilles® à base de soufre produit par Syngenta peut aussi être considéré comme un produit de biocontrôle.

iv. La sélection variétale

La sélection variétale est une des stratégies considérées comme la plus écologique et la plus prometteuse pour prévenir efficacement l'accumulation de mycotoxines dans les récoltes de maïs. Pour exemple, dès 2007, Schaafsma and Hooker rapportent une diminution de 25% de la teneur en DON chez le maïs par l'emploi de certains hybrides (Schaafsma & Hooker 2007).

Les premiers programmes de sélection étaient basés sur du phénotypage des symptômes sur des plantes non inoculées (cultivées dans des lieux avec de fortes pressions de maladies), ou inoculées artificiellement avec différentes techniques, *i.e.* par le canal des soies ou par blessure sur l'épi. Ces approches de phénotypage ont rapidement montré leurs limites du fait de la génétique complexe du maïs et du caractère polygénique de la résistance au GER impliquant un réseau complexe de voies de signalisation mais aussi du fort impact des conditions environnementales. Les programmes se sont ainsi rapidement orientés vers de la sélection assistée par marqueurs. Cette approche porte sur l'étude de caractères quantitatifs, « Quantitative Trait Loci » (QTL), par cartographie de la résistance. Des avancées significatives ont été obtenues grâce à cette approche chez le blé, menant à la découverte de plus de 550 QTL regroupés dans 65 méta-QTLs (Venske *et al.* 2019). Chez le maïs, les études de QTL contre la fusariose de la tige ont commencé dès 1993 (Enrico Pè *et al.* 1993). Par la suite, plusieurs QTL liés à la résistance des soies et des grains au GER ont été identifiés chez une lignée de maïs recombinante avec cependant de fortes influences de l'environnement (Ali *et al.* 2005). Plus récemment encore, plusieurs études basées sur des germoplasmes ont identifié de nombreux QTLs expliquant 21 à 59% de la variation génotypique (Miedaner *et al.* 2020). De plus des QTLs regroupant des effets sur le GER et la présence de DON dans les grains avec de fortes corrélations ont été identifiés. Deux QTLs majeurs avec des effets expliquant 29 et 35% de la variation génotypique ont été reportés dans une étude de Martin *et al.* (Martin *et al.* 2011) portant sur des maïs européens. Cependant, les études de cartographie génétique chez le maïs sont souvent variables suivant les populations à cause de facteurs comme la ségrégation des QTLs dans les différentes populations, les

interactions entre les fonds génétiques et l'environnement, ou les interactions entre les QTLs et l'environnement (Bernardo 2008). Ces études de QTLs ont exclusivement été conduites sur des populations indépendantes, ce qui freine leur généralisation à toutes les espèces de maïs. De plus, la plupart des QTLs détectés n'explique finalement qu'une faible proportion de la variance totale.

Le but final de toutes ces études est la mise en évidence de gènes cibles (régions génomiques) pour permettre leur introgression dans de nouvelles génétiques, que ce soit par des méthodes d'hybridation classique, ou par utilisation de méthode d'ingénierie génétique dans les régions du monde où cela est autorisé. Cette connaissance permettrait aussi l'utilisation de nouveaux outils tels que le screening à haut débit, ou encore de méthodes de prédictions de croisements (Predictive Breeding) qui conduiraient à un gain de temps considérable dans les programmes de sélection.

Pour progresser dans le développement de génotypes de maïs résistants à GER et accumulant moins de DON, certains auteurs ont proposé de mettre en place une stratégie combinant différentes approches expérimentales telles que approches QTL, transcriptomique et métabolomique (Miedaner *et al.* 2020). Les approches métabolomiques pourraient effectivement apporter de nouvelles informations sur les mécanismes de résistance à *F. graminearum* et conduire à de nouveaux biomarqueurs de sélection. De nombreux métabolites secondaires liés à la résistance ont ainsi été mis en évidence (Gauthier *et al.* 2015). Ces métabolites sont essentiellement des phénylpropanoïdes et très peu d'études se sont intéressées à des composés plus apolaires tels que les xanthophylles qui sont au cœur de ce projet de doctorat.

4- Composante chimique de la résistance des maïs à GER

a. Les différents niveaux de résistance du maïs à GER

La résistance à la fusariose de l'épi a d'abord été caractérisée chez le blé et divisée en cinq types (Mesterházy *et al.* 1999). Cette division en cinq composantes peut aussi être transférée au maïs (Figure 13).

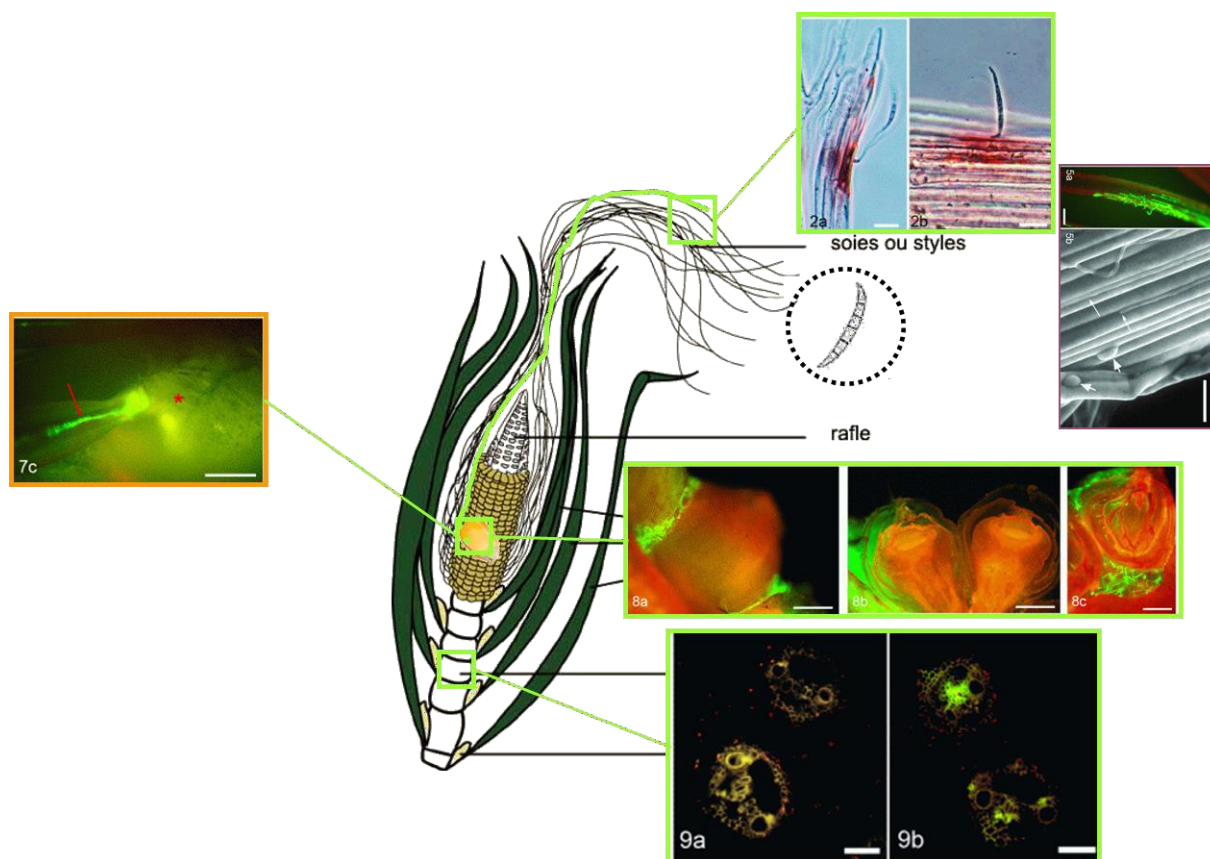


Figure 13. Photos des différents niveaux de résistance à l'infection des épis de maïs par *F. graminearum*. Les photos sont issues de la publication de Miller *et al.* (Miller *et al.* 2007).

Le premier niveau de résistance est la résistance à l'infection initiale (Type I). Cette résistance est associée chez le maïs à la résistance des soies (résistance passive). En effet, au moment de l'infection par *F. graminearum*, l'épi est protégé du champignon par les spathes, par conséquent le canal des soies est la seule voie d'entrée du champignon. Ainsi il a été observé que la sévérité des symptômes était dépendante de la quantité de tissus des soies et de leur dégradation (Reid *et al.* 1992a). L'âge des soies est un élément important car le maximum de leur sensibilité survient dans les 6 premiers jours après leur émergence (Munkvold 2003). La résistance des soies à *F. graminearum* pourrait être liée à leur teneur en composés phénoliques. Cette hypothèse est étayée par les travaux de Bily *et al.* (Bily *et al.* 2003) qui ont suggéré que l'acide férulique et ses formes dimériques étaient impliquées dans la résistance de type I à l'infection par *F. graminearum*. Il a aussi été observé que les génotypes qui présentaient une moindre sensibilité à l'infection possédaient des teneurs élevées en phénylpropanoïdes (Reid *et al.* 1992b). Plus récemment, les travaux de Cao *et al.* (Cao *et al.* 2011) appuient l'idée d'un rôle clef des acides hydroxycinnamiques, qui de par leur implication dans la consolidation des parois végétales (Ye *et al.* 2013) participeraient à la résistance mécanique des soies. Le second niveau de résistance est la résistance à la propagation du champignon (Type II). Cette résistance correspond à la résistance des grains à la pénétration du champignon et à sa propagation

entre les grains. Certains métabolites capables de renforcer les barrières physiques du grain tels que les phénylpropanoïdes, les acides gras ou les terpènes, mais aussi des composés capables d'inhiber la croissance du champignon ou sa production de mycotoxines contribuent à la résistance de type II. Les troisièmes et quatrièmes niveaux de résistance (Type III et type IV) sont très corrélés et correspondent respectivement au maintien du nombre et de la taille des grains et à la tolérance au rendement. Enfin le dernier niveau de résistance correspond à la résistance à l'accumulation de TCTBs (Type V). Il se subdivise en deux sous types, la résistance V-I associée à la dégradation et/ou la détoxification des TCTBs et la résistance V-II qui correspond à l'inhibition de leur biosynthèse. La résistance de type V-I est la mieux documentée. En effet, l'activité de certaines enzymes de plantes catalysant la transformation du DON en des formes moins phytotoxiques a été largement illustrée. Parmi ces enzymes on retrouve des UDP-glycosyltransférases, des glutathion-S-transférases ou les cytochromes P450 mono-oxygénases. Les réactions de glycosylation du DON dans les tissus végétaux sont de loin les plus étudiées (Jones & Vogt 2001). De plus, le QTL *Qfhs.ndsu-3BS* identifié comme impliqué dans la résistance à la fusariose chez le blé contient un gène codant pour une DON-glycosyltransférase (Lemmens *et al.* 2005). Une corrélation entre la présence de ce QTL et la formation de DON-3-glucoside chez le blé a aussi été démontrée (Kluger *et al.* 2015). Ces mécanismes de détoxification du DON jouent un rôle dans la résistance des céréales mais il ne peut pas être exclu que les toxines glycosylées soient reconverties dans leur forme aglycone par hydrolyse après ingestion par les mammifères, comme cela a été démontré pour la zéaralénone glycosylée (Gareis *et al.* 1990).

b. Le rôle des phytohormones dans les mécanismes de défense.

Les principales phytohormones comprennent l'acide abscissique, l'acide jasmonique, l'acide salicylique, l'éthylène, l'auxine, des cytokinines, des gibbérellines, des strigolactones et des brassinostéroïdes. Les acides jasmonique et salicylique ainsi que l'éthylène jouent un rôle clef dans l'orchestration des défenses des plantes en réponse aux bioagresseurs et en particulier aux agents pathogènes fongiques. Dans le contexte de la fusariose des céréales, la majorité des études ciblant le rôle des phytohormones a porté sur le modèle blé. Leur contribution dans la réponse du maïs à *F. graminearum* a été mise en évidence par de plus rares études, essentiellement basées sur des approches transcriptomiques (Liu *et al.* 2016; Yuan *et al.* 2020).

Parmi les phytohormones étudiées pour leurs implications dans la résistance à *F. graminearum*, on retrouve l'acide abscissique et l'acide gibbérellique, mais les plus documentées sont l'acide salicylique et la voie de l'acide jasmonique et de l'éthylène. L'acide abscissique semble promouvoir les infections par le champignon en activant les gènes liés à l'infection comme des hydrolases et à la réorganisation

cytosquelettique, tandis que l'acide gibbérellique réprimerait l'expression de plusieurs gènes du champignon impliqués dans le métabolisme de l'azote (Buhrow *et al.* 2016).

Il est décrit que l'acide salicylique joue un rôle clef dans la défense des plantes contre les agents pathogènes fongiques biotrophes et hémibiotrophes (rappelons ici que *F. graminearum* est considéré comme un hémibiotrophe) ainsi que dans la résistance systémique acquise (Grant & Lamb 2006) alors que l'éthylène et l'acide jasmonique seraient plus impliqués dans la défense contre les nécrotrophes. Les voies de signalisation liées à ces différentes hormones ne sont cependant pas indépendantes. Ethylène et acide jasmonique peuvent avoir un rôle antagoniste de celui de l'acide salicylique (Kunkel & Brooks 2002). Les voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène sont étroitement liées, en effet certains gènes régulés par l'acide jasmonique le sont aussi par l'éthylène.

Dans l'interaction de *F. graminearum* avec le blé, le rôle de l'acide salicylique a été étayé par l'étude de Makandar *et al.* (Makandar *et al.* 2012) qui a montré le lien entre stimulation de la synthèse d'acide salicylique, l'augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine PR1 (pathogen-related 1) et la diminution des symptômes de fusariose et de l'accumulation de DON dans les épis. Il est aussi décrit que la mort cellulaire induite par une infection fongique peut stimuler la production d'acide salicylique, qui conduit à des réactions hypersensibles et permet ainsi de contenir la progression de l'agent pathogène (Glazebrook 2005).

L'acide jasmonique fait partie de la famille des oxylipines qui sont des molécules lipophiles dérivées de l'oxydation des acides gras polyinsaturés sous l'effet des lipoxygénases. Les oxylipines ont été étudiées de par leurs capacités à moduler différents mécanismes chez les champignons comme la production de spores, le développement fongique, la reproduction ou encore la production de métabolites secondaires (Brodhagen *et al.* 2008; Battilani *et al.* 2018; Qiu *et al.* 2021). De plus, l'implication des lipoxygénases et de leurs produits d'oxydation dans la sensibilité aux champignons toxigènes a aussi été mise en évidence : la 9-lipoxygénase chez le blé (Nobili *et al.* 2014; Nalam *et al.* 2015) et la 9-lipoxygénase *ZmLOX3* chez le maïs (Gao *et al.* 2009) seraient des facteurs de sensibilité. Le rôle de l'acide jasmonique dans la résistance à *F. graminearum* et aux autres agents pathogènes fongiques hémibiotrophes n'est pas encore totalement élucidé : (i) de par sa fonction antagoniste de l'acide salicylique, l'acide jasmonique pourrait conduire à une sévérité plus importante de l'infection, (ii) en contribuant à la résistance de la plante au cours de la phase nécrotrophique du cycle d'infection, la voie de l'acide jasmonique interviendrait dans les mécanismes de limitation des symptômes. L'importance de l'acide jasmonique a notamment été observée chez le blé par des études de transcriptomique (Li & Yen 2008; Wang *et al.* 2018). Il est aussi connu que l'acide jasmonique peut influencer le dépôt de callose à la base des épillets. Ce dépôt de callose chez le blé est un mécanisme

limitant la progression de *F. graminearum* dans l'épi (Yi *et al.* 2014). Enfin, l'acide jasmonique est aussi impliqué dans la défense contre les insectes (Wang *et al.* 2021) qui sont eux-mêmes des facteurs aggravant le GER.

Le rôle de l'éthylène dans la résistance à *F. graminearum* demande toujours à être précisé ; les travaux de Foroud *et al.* (Foroud *et al.* 2019) ont suggéré une contribution positive de l'éthylène à la résistance contre *F. graminearum* alors que ceux de Sun *et al.* (Sun *et al.* 2016) ont conclu à une absence de contribution significative. Les différents effets de l'acide salicylique et de la voie de l'acide jasmonique/éthylène sont résumés dans la figure 14.

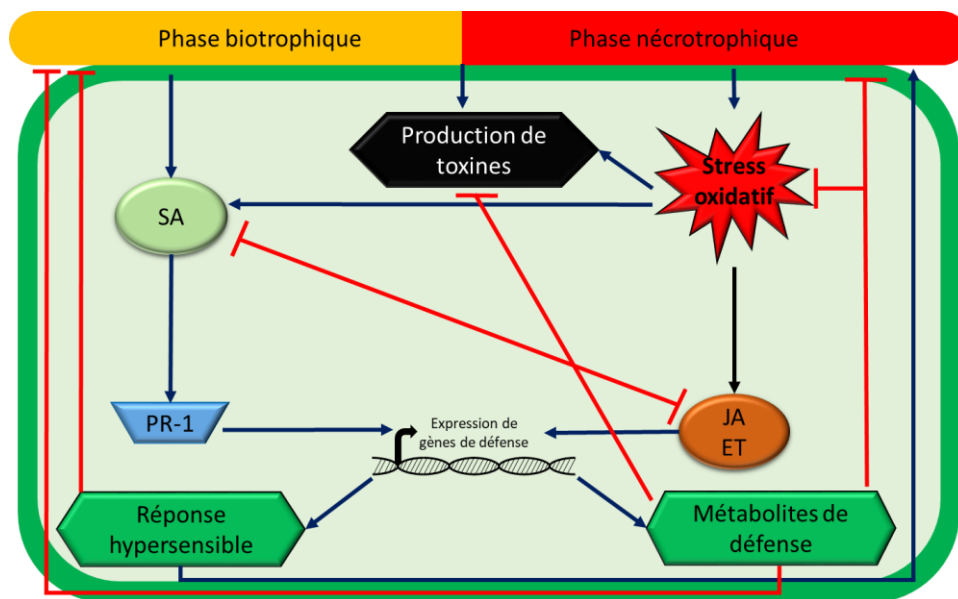


Figure 14. Schéma récapitulatif des implications des phytohormones dans la résistance à *F. graminearum*. SA : Acide salicylique ; JA : acide jasmonique ; ET, éthylène. Les flèches bleues représentent des effets activateurs et les flèches rouges des effets inhibiteurs. Adapté de Shigenaga A and Argueso C. (Shigenaga & Argueso 2016)

Il est important de signaler ici que les voies de biosynthèse de ces phytohormones sont aussi susceptibles d'être affectées par les métabolites secondaires des plantes. Ceci est en particulier le cas de l'acide jasmonique et des métabolites antioxydants. Le chapitre 3 de la revue reportée en fin de ce paragraphe décrit cette interaction.

c. Les métabolites secondaires du maïs impliqués dans les mécanismes de défense

Les métabolites secondaires des plantes sont communément classés en trois familles : les alcaloïdes et composés azotés, les composés phénoliques et les composés terpéniques. Les grains de maïs sont caractérisés par une très grande diversité de métabolites secondaires (Gálvez Ranilla 2020) dont certains sont susceptibles de contribuer aux mécanismes de défense contre *F. graminearum* (Gauthier

et al. 2015). Les plus étudiés pour cette contribution sont les phénylpropanoïdes et en particulier les acides phénoliques alors que le rôle des xanthophylles reste beaucoup moins documenté.

i. Diversité des profils en acides phénoliques, caroténoïdes et tocochromanols des maïs

Les acides phénoliques font partie des phénylpropanoïdes. Ces composés représentent la majorité des composés phénoliques dans les soies de maïs et dans les grains ; dans les grains, leur concentration diminue avec la maturation (Atanasova-Penichon *et al.* 2012). Les acides phénoliques sont pour la plupart des molécules simples qui possèdent au moins un cycle aromatique substitué par un ou plusieurs groupes hydroxyl (Salinas-Moreno *et al.* 2017). Les acides phénoliques retrouvés dans le maïs sont dérivés des acides benzoïque et cinnamique. Ils peuvent être présents sous forme libre solubles, liés à des oses ou sous forme liés insolubles. La revue de Marchiosi *et al.* (Marchiosi *et al.* 2020) illustre la diversité de structures et rôles associés à ces composés dans les plantes et décrit leur voie de biosynthèse (principalement la voie du shikimate chez les plantes).

Les différents acides phénoliques présents dans les grains et soies de maïs ainsi que leur abondance relative sont reportés dans le tableau 4. Le composant majoritaire des acides phénoliques dans les grains à maturité est l'acide férulique qui peut atteindre $1500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de maïs, suivi des acides *o*-coumarique et *p*-coumarique (Van Hung 2016; Trehan *et al.* 2018; Rodríguez-Salinas *et al.* 2020; Horvat *et al.* 2020). Cet acide férulique est majoritairement lié aux composants structuraux des parois cellulaires (Fernandez-Orozco *et al.* 2010; Van Hung 2016). On retrouve aussi dans les grains matures des acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique, caféique et syringique. Aux stades précoces du développement du grain (gonflement, laiteux), l'acide phénolique soluble prédominant est l'acide chlorogénique. Il a été montré que les teneurs en acides phénoliques des maïs diminuaient au cours de la maturation du grain ; pour exemple, l'acide chlorogénique n'est plus détecté à maturité (Atanasova-Penichon *et al.* 2012). La connaissance sur la composition en acides phénoliques des soies est moins étendue que pour les grains. On retrouve dans les soies plusieurs acides phénoliques, avec une majorité d'acide chlorogénique dans les soies fraîches, mais aussi de l'acide férulique et *p*-coumarique (Sukalović *et al.* 2010). Une étude plus récente a démontré que l'acide phénolique le plus important dans les soies de maïs est l'acide férulique ; les acides protocatéchuïque, hydroxybenzoïque, chlorogénique, *p*-coumarique et coumarique, caféique, syringique, gallique, sinapique ou encore vanillique sont aussi présents mais en très faibles concentrations (Foss *et al.* 2022).

Parmi les cultures céréalières, les maïs sont reconnus comme très riches en caroténoïdes, composés qui confèrent la couleur jaune/orange aux grains (Ortiz-Monasterio *et al.* 2007; Picot *et al.* 2013;

Meléndez-Martínez *et al.* 2022). Les caroténoïdes sont des tétraterpénoïdes issus de la cyclisation du lycopène, ils ont un squelette de 40 carbones cyclisé aux deux extrémités. Ils se différencient selon le degré d'oxydation de leurs cycles, ainsi que par la place des doubles liaisons sur le premier cycle. Les formes non oxydées les plus simples sont les α - et β -carotènes. La voie de biosynthèse des caroténoïdes a été décrite chez le maïs (Trono 2019) et est très bien connue pour l'ensemble des plantes supérieures (Zhai *et al.* 2016). Cette voie est reportée sur la Figure 15.

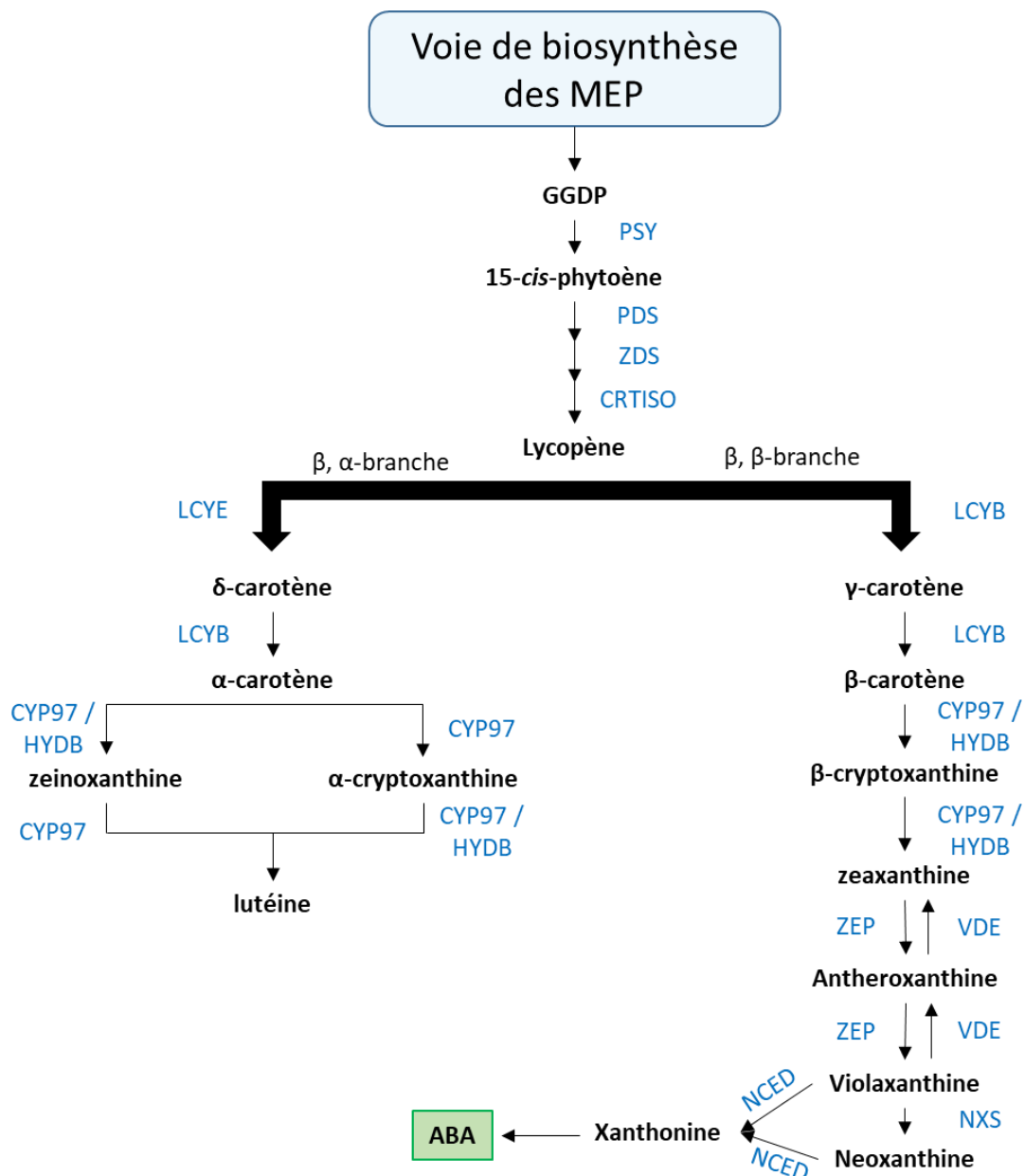
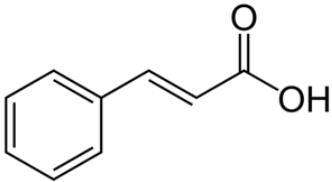
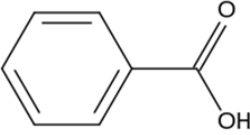
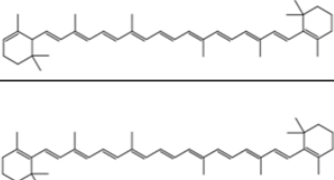


Figure 15. Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes supérieures. ABA, Acide abscissique ; CRTISO, carotène isomérase ; CYP97, cytochrome P450 β -ring hydroxylase ; GGDP, géranylgeranyl diphosphate ; HYDB, β -carotène hydroxylase ; LCYB, lycopène β -cyclase ; LCYE, lycopène ϵ -cyclase ; MEP, méthylérythritol phosphate ; NCED, 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygénase ; NXS, neoxanthine synthase ; PDS, phytoène désaturase ; PSY, phytoène synthase ; VDE, violaxanthine déépoxydase ; ZDS, ζ -carotène désaturase ; ZEP, zeaxanthine époxidase. Adapté de Zhai *et al.* et Trono (Zhai *et al.* 2016; Trono 2019).

Dans les grains de maïs, les concentrations en caroténoïdes totaux peuvent atteindre entre 10 et 63 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Parmi ceux-ci, les plus représentés dans les grains sont la lutéine et la zéaxanthine avec des échelles respectives allant de 1 à 24 $\mu\text{g.g}^{-1}$ et de 1 à 32 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Maurer *et al.* 2014; Trono 2019; Zurak *et al.* 2021; Sun *et al.* 2022). On retrouve ensuite en teneur plus faible, la β -cryptoxanthine (0.13 à 5.17 $\mu\text{g.g}^{-1}$), le β -carotène (0.31-3.27 $\mu\text{g.g}^{-1}$) et enfin des traces d' α -carotène (0.45-2.65 $\mu\text{g.g}^{-1}$). La structure de base et les abondances relatives des caroténoïdes présents dans les grains de maïs sont reportées dans le tableau 4.

Tableau 4. Structure et abondance des acides phénoliques et des caroténoïdes dans le maïs.

Composés	Noms	Structures de base	Abondance	
			Soies	Grains
Acides cinnamiques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque		+	+
	Caféique		+	+
	Sinapique		+	-
	<i>o</i> - / <i>p</i> -coumarique		++	++
	Férulique		+++	+++
	Chlorogénique		+++	++
Acides phénoliques	Syringique		+	+
	Vanillique		+	+
	Gallique		+	-
	Protocatéchuïque		+	-
Caroténoïdes	α -carotène		ND	+
	Lutéine		ND	+++
	β -carotène		ND	++
	β -cryptoxanthine		ND	++
	Zéaxanthine		ND	+++

Les + et – représentent l'abondance relative, +++ : très abondant ; ++ : abondant ; + : présent ; - : absent, ND : données non disponibles.

Les tocochromanols sont des composés lipophiles aux propriétés antioxydantes reconnues qui sont présents dans les maïs. Les tocochromanols comprennent les tocophérols et tocotriénols. Ils ont aussi été fortement étudiés pour leur implication dans les mécanismes de réponse aux stress abiotiques ; leur rôle dans la réponse aux stress biotiques reste très peu documenté. Leur structure et diversité sont détaillées dans la revue reportée à la suite de l'introduction.

ii. Contribution des métabolites secondaires du maïs aux mécanismes de défense contre *F. graminearum* et l'accumulation de DON

La contribution des acides phénoliques dans les mécanismes de défense des céréales contre les agents fongiques toxigènes a fait l'objet de nombreuses études. Elle est associée à leurs propriétés antioxydantes, leur activité antifongique et anti-mycotoxine, leur contribution au renforcement des parois végétales et leur rôle de « molécule signal ». La connaissance sur l'implication des caroténoïdes dans la réponse des céréales à l'infection par un agent pathogène fongique est moins étayée. Elle est essentiellement basée sur leurs propriétés antioxydantes et leur interaction avec la voie de biosynthèse de l'acide abscissique. Quant aux tocochromanols, s'ils ont été montrés comme importants dans la résistance des plantes aux stress abiotiques, très rares sont les études s'intéressant à leur contribution aux mécanismes de défense contre des stress biotiques.

Dans la revue reportée ci-dessous, l'état des connaissances sur les rôles joués par les phénylpropanoïdes et caroténoïdes sont résumés dans la partie introductive ; le faisceau d'hypothèses suggérant une contribution significative des tocochromanols fait l'objet d'une argumentation plus détaillée.

Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxigenic Fungal Species

(Revue publiée dans International Journal of Molecular Sciences, doi.org/10.3390/ijms23169303)



Review

Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxigenic Fungal Species

Jean-Marie Savignac ^{1,2} , Vessela Atanasova ¹ , Sylvain Chéreau ¹ , Véronique Ortéga ² and Florence Richard-Forget ^{1,*}

¹ INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), 33882 Villenave d'Ornon, France

² Syngenta France SAS, 32220 Lombez, France

* Correspondence: florence.forget@inrae.fr



Citation: Savignac, J.-M.; Atanasova, V.; Chéreau, S.; Ortéga, V.; Richard-Forget, F. Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxigenic Fungal Species. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9303. <https://doi.org/10.3390/ijms23169303>

Academic Editor: Steve Peigneur

Received: 5 July 2022

Accepted: 16 August 2022

Published: 18 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Fungal pathogens capable of producing mycotoxins are one of the main threats to the cultivation of cereals and the safety of the harvested kernels. Improving the resistance of crops to fungal disease and accumulation of mycotoxins is therefore a crucial issue. Achieving this goal requires a deep understanding of plant defense mechanisms, most of them involving specialized metabolites. However, while numerous studies have addressed the contribution of phenylpropanoids and carotenoids to plant chemical defense, very few have dealt with tocochromanols. Tocochromanols, which encompass tocopherols and tocotrienols and constitute the vitamin E family, are widely distributed in cereal kernels; their biosynthetic pathway has been extensively studied with the aim to enrich plant oils and combat vitamin E deficiency in humans. Here we provide strong assumptions arguing in favor of an involvement of tocochromanols in plant–fungal pathogen interactions. These assumptions are based on both direct effects resulting from their capacity to scavenge reactive oxygen species, including lipid peroxy radicals, on their potential to inhibit fungal growth and mycotoxin yield, and on more indirect effects mainly based on their role in plant protection against abiotic stresses.

Keywords: tocochromanol; tocopherol; tocotrienol; cereal; fungal pathogen; mycotoxin; plant defense

1. Introduction

For billions of people around the world, cereals provide the most accessible source of energy and are the principal components of the diet. Cereals rank among the most widespread crops worldwide. In 2020, world cereal production amounted to over 2650 Mt; this production is projected to expand by 375 Mt to reach more than 3000 Mt in 2029 [1]. Cereal production can, however, be injured by various types of stress, both abiotic and biotic, whose combined effect can adversely affect yield performance and grain quality. The main abiotic stresses that plants have to face include extreme temperatures, drought, salinity, and soil nutrient limitations. Regarding biotic stresses, viruses, fungi, bacteria, weeds, insects, and other pests can lead to more than 20% crop yield losses, as illustrated by the recent survey published by Savary et al. [2]. In addition to direct yield losses, some fungal species infecting cereals can also produce mycotoxins that are harmful to humans and livestock and pose potential health threats. The major mycotoxin-producing fungal genera are *Aspergillus* (producer of aflatoxins and ochratoxins), *Fusarium* (producer of trichothecenes, zearalenone, and fumonisins), and *Penicillium* (producer of ochratoxins). Whereas in northern countries, *Aspergillus* and *Penicillium* species are commonly considered as storage fungi since they usually invade grains during storage, *Fusarium* species most frequently invade the grains before harvest while the crop is still in the field. Actually, *Fusarium* head blight in small grain cereals and *Giberella* ear rot and *Fusarium* ear rot in

maize, are all three caused by *Fusarium* species and are major devastating diseases that are extremely challenging to control.

To cope with such a diversity of biotic and abiotic stresses, plants have evolved multiple defense mechanisms, several of them relying on secondary (or specialized) metabolites and hormones [3]. Plant secondary metabolites are divided into three major groups: phenylpropanoids, terpenoids, and N- and S-containing compounds. Phenylpropanoids, both flavonoids and non-flavonoid compounds, have been the most widely studied for their contribution to plant defense mechanisms [4]. Phenylpropanoids have been proven to play a central role in plant defense through their capacity to minimize the generation of reactive oxygen species (ROS) and to quench ROS once they are formed and therefore protect plants from oxidative damage [5]. In addition, many phenylpropanoids have been shown to possess antibacterial and antifungal properties, to act as plant defense system mediators and, for some of them, as precursors of physical defense processes such as cell wall lignification [6]. Indeed, lignin and lignans that are responsible of cell wall thickening are nearly exclusively based on phenylpropanoid units derived from the oxidative polymerization of hydroxycinnamoyl alcohol derivatives [7]. Moreover, in addition to displaying antifungal properties, several phenylpropanoids can affect the production of mycotoxins. There is notably a large body of evidence that supports the inhibitory activities of hydroxycinnamic acid derivatives, mainly *p*-coumaric, ferulic, caffeic, and chlorogenic acids, towards the biosynthesis of various mycotoxins including deoxynivalenol, type A trichothecenes, fumonisins, and aflatoxins [8]. Some flavonoids (e.g., naringenin and quercetin) have also been shown to exert an inhibitory effect on mycotoxin production, such as type B trichothecenes [9]. In addition to phenylpropanoids, plant-specialized terpenoids are also considered as key chemical mediators of abiotic and biotic interactions [10]. Terpenoids are the largest class of secondary metabolites in plants, characterized by a high diversity of physical and chemical properties, including hydrophilic, lipophilic, and volatile or non-volatile metabolites. Much attention has been paid to the role of the volatile fraction of terpenoids, predominantly consisting of hemiterpenoids, monoterpenoids and sesquiterpenoids, in controlling pests [11]. Additionally, some volatile compounds, such as linalool derivatives, have been shown to be released by plant tissues in response to fungal infection and to act as antifungal agents [9]. An antifungal and antimicrobial activity has also been demonstrated for some non-volatile diterpenoids, such as phytocassane, which can disrupt microbial membranes [12]. In addition, there is a large body of evidence for an active and important role of abscisic acid, a sesquiterpenoid plant hormone, in plant-pathogen interactions. This role can be related to its regulatory effect on callose deposition, which provides physical barriers against plant fungal pathogens and to its capacity to control stomatal aperture [13]. Moreover, abscisic acid has been proven to interact with the ethylene signaling pathway and to counteract the spread of some necrotrophic fungal pathogens that exploit the ethylene signaling pathway to enhance colonization of plant tissues [14]. In addition to their role in the biosynthesis of abscisic acid, carotenoids, a group of tetraterpenoids, possess strong antioxidant capacities and are capable of quenching various ROS and, notably, the lipid peroxy radical (LOO•), thus providing plant cell membrane protection [15]. As demonstrated for capsanthin and capsorubin [16], plant carotenoids are also likely to act as antifungal and antimycotoxin agents. Similarly, tocochromanols are plant compounds with a strong antioxidant potential. The biosynthesis of this class of compounds draws on metabolites from the terpenoid and shikimate pathways. Tocochromanols are acknowledged to efficiently quench singlet oxygen and scavenge various radicals, especially lipid peroxy radicals derived from polyunsaturated fatty acids, thereby terminating lipid peroxidation chain reactions [17]. However, notwithstanding their potent antioxidant activity, their ecological role in plant defense mechanisms has been much less studied and mainly restricted to a contribution to resistance to abiotic stresses [18–22]. Regarding tolerance to light stress, the protective role of tocochromanols, which are located in photosynthetic membranes, has been ascribed to their capacity to scavenge singlet oxygen produced in the photosystem II triplet [23]. Their contribution to drought stress

tolerance has been related to their capacity to affect the fluidity of thylakoids or to alter intracellular signaling by modulating jasmonic acid synthesis [18]. Such physiological roles of tocochromanols strongly argue in favor of a key contribution of this class of as yet scarcely studied compounds in plant–pathogen interactions.

The aim of this review is to gather the most recent knowledge on tocochromanols in cereals and to highlight recent insights that support the key role this class of compounds could play in the mechanisms cereals employ to cope with biotic stresses, notably with the threat represented by toxigenic fungal species.

2. Tocochromanols in Cereals

2.1. Tocochromanol Structure

Tocochromanols encompass tocopherols and tocotrienols and are the main components of the vitamin E family. They are exclusively synthesized by photosynthetic eukaryotes and other oxygenic photosynthetic organisms, such as cyanobacteria, and are essential phytonutrients for mammals. In addition, whereas tocopherols are widely distributed in higher plants, tocotrienols occur only in some non-photosynthetic tissues including seeds, roots, and tubers [24]. Their general structure (reported in Figure 1) consists of a polar chromanol ring and a hydrophobic 16-carbon side chain attached to the ring via the C-2 atom. While tocopherols have fully saturated 16-carbon phytol side-chains, tocotrienols contain geranylgeranyl side chains with three double bonds in positions C-3, C-7, and C-11. As indicated in Figure 1, both tocopherols and tocotrienols can occur as four isomers (α , β -, γ -, and δ -) that differ from each other by the number and position of methyl groups in the chromanol ring. The α -isomers are tri-methylated in positions 5, 7, and 8, β - and γ -tocochromanols are di-methylated in position 5 and 8 or in position 7 and 8, respectively, and δ -isomers are methylated in position 8. The chromanol ring forms the basis for the high antioxidant potency of tocochromanols, this potency being modulated by the structure and length of the isoprenoid chains. Actually, tocochromanols are acknowledged as the lipid-soluble antioxidant metabolites possessing the highest capacity to scavenge free radicals [25]. This is particularly true for α -isomers, which show the highest antioxidant activity among tocochromanols.

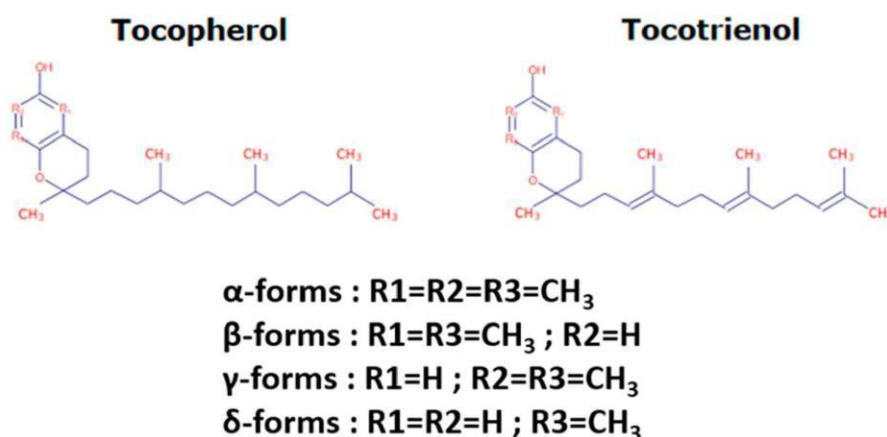


Figure 1. Tocochromanol structure.

2.2. Tocochromanol Biosynthesis

The biosynthetic pathway of tocochromanols has been well documented and we strongly encourage the readers to seek out detailed information in comprehensive studies that have been previously published [24,26–30]. A summary description of this biosynthetic pathway, which starts in the plant cytoplasm for the first steps and then takes place in the plastids [31], is provided in Figure 2. The precursor of the tocochromanol biosynthesis is the aromatic head group homogentisate that derives from the catabolism

of tyrosine into p-hydroxyphenylpyruvate under the action of p-hydroxyphenyl pyruvic acid dioxygenase. The biosynthesis starts with the condensation of homogentisate with different polyprenyl pyrophosphates that determine the type of tocochromanol, phytol-diphosphate for tocopherols and geranylgeranyl-diphosphate for tocotrienols. Phytol-diphosphate derives from the methylerythritol phosphate pathway, more precisely from phytol through the successive action of a phytol kinase and a phytol phosphate kinase. Another pathway leading to the production of phytol-diphosphate is the phytol-recycling pathway derived from the chlorophyll degradation [32,33]. Geranylgeranyl diphosphate is produced from phytol-diphosphate *via* a reaction catalyzed by the geranylgeranyl reductase. Prenylation of homogentisate with phytol-diphosphate that leads to the formation of 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol is allowed by the activity of the homogentisate phytol transferase. For tocotrienols, the prenylation of homogentisate with geranylgeranyl diphosphate is catalyzed by the homogentisate geranylgeranyl transferase that is only located in non-photosynthetic tissues and results in the yield of 2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol [31]. 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol is acted upon by the tocopherol-cyclase to yield δ -tocopherol or by the 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol-methyl transferase, leading to the formation of 2,3-dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol and the tocopherol-cyclase to form γ -tocopherol. The final step of tocopherol biosynthesis involves the methylation of δ - and γ -tocopherols to their β - and α - isomers, respectively, under the effect of the γ -tocopherol methyltransferase [34]. α -, β -, δ - and γ -Tocotrienols derive from 2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol, which undergoes the same sequence of methylation and cyclization as 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol with the involvement of the 2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol-methyltransferase, the tocopherol-cyclase, and γ -tocopherol methyltransferase.

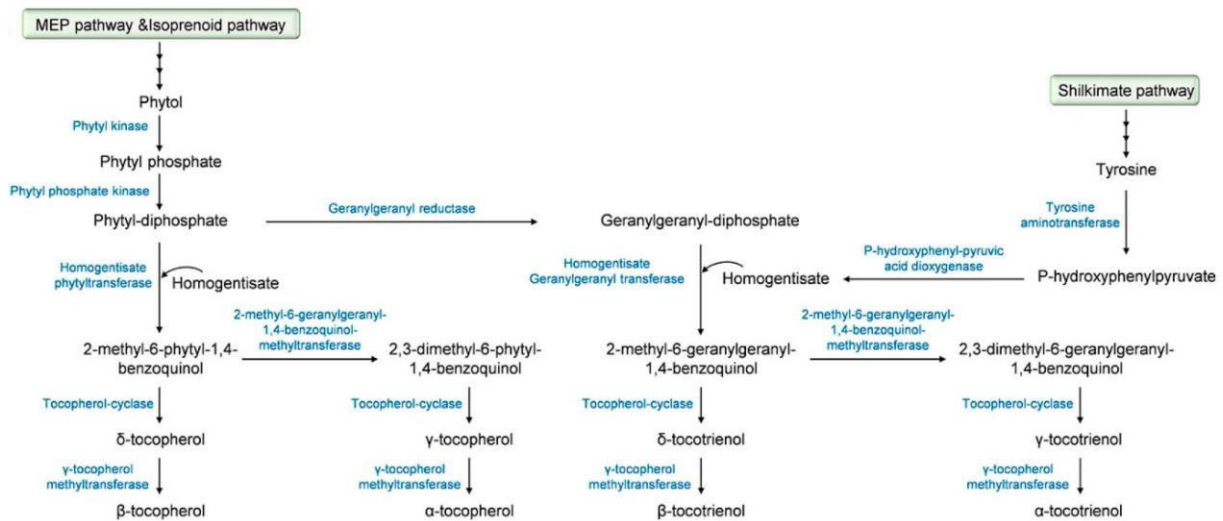


Figure 2. Tocochromanol biosynthetic pathway.

Knowledge regarding the key genes involved in tocochromanol biosynthesis has initially focused on *Arabidopsis thaliana*, being facilitated by the access to *Arabidopsis* mutant collections and the possibility to use transgenic plants [35]. These key biosynthetic genes are reported in Table 1. In various cereal crops, including maize, barley, and rice, linkage analysis studies of natural variation for tocochromanol levels have led to the identification of QTLs containing tocochromanol biosynthetic genes in their support intervals [36]. Many of these studies were conducted with a common objective, i.e., improving breeding strategies to increase tocochromanol contents and enriching vegetable oils in vitamin E.

Thus, a genome-wide association approach allowed Schuy et al. [37] to identify two key genes in barley, the homogentisate phytoltransferase (*HPT*) and the homogentisate

geranygeranyltransferase (*HGGT*) genes; these two genes were shown to be located on chromosome 7H. In maize, candidate genes encoding the core tocochromanol pathway (*ZmVTE* genes) have also been characterized [28]. Regarding oats, the coding sequences of three genes (*HPPD*, *VTE2* and *VTE4*) have been elucidated [38]. In rice, biosynthetic genes were first identified by comparative genomics with *Arabidopsis thaliana* by Chaudary and Khurana [39], and the function of a few of them (e.g., *OsGGR1* and *OsGGR2*) was further validated using a transgenic approach [40]. The former studies were completed by QTL analyses that have led to clarifying the location of *Os γ TMT*—the gene encoding the γ -tocopherol methyltransferase—on chromosome 2 [41].

In addition to genes involved in the biosynthetic pathway, genes or genomic areas associated with the natural variations of tocochromanols have been identified. As an example, the gene *LIL3* coding for a light-harvesting-like protein involved in the stabilization of the geranylgeranyl reductase enzyme is a key actor of the genetic control of tocochromanols in *Arabidopsis thaliana* [42]. Significant insights have also been recently published regarding the genetic determinants that govern the accumulation of tocochromanols in maize; more than 40 genomic areas that do not carry the biosynthetic genes have been related to tocochromanol variations [36]. Among candidate genes identified in the latter study and further supported by the findings of Zhan et al. [43], homologs of protochlorophyllide reductase (*por*) genes (*por1* and *por2*) have been shown to account for large allelic effect for tocochromanol traits. These two genes are known to be involved in the regulation of chlorophyll biosynthesis and their association with tocochromanol variations in maize kernels, i.e., kernels that do not contain chlorophyll, first raised numerous questions. These questions were however rapidly resolved with the demonstration that developing maize embryos contain low levels of chlorophyll [36]. In addition to *por* genes, genes coding for plastid-localized fibrillins and cytosolic glycol lipid transfer and SNARE proteins located on four QTLs (QTL10, QTL30, and QTL6) were also suggested to be responsible for tocochromanol phenotypic variation in maize kernels [36]. In addition, a recent study has indicated the occurrence of genes of the fatty acid pathway in several maize QTLs related to tocochromanol accumulation, suggesting the occurrence of a crosstalk between tocochromanol and fatty acid pathways [44].

Table 1. Key genes involved in tocochromanol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* and various cereal crops.

Plant Species	Gene	Enzyme ¹	Ref.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>PSD1</i>	HPPD	[45]
	<i>GGR</i>	GGR	[46]
	<i>VTE1</i>	Tocopherol cyclase	[35]
	<i>VTE2</i>	HPT	[35]
	<i>VTE3</i>	MPBQ/MGGBQ MT	[47]
	<i>VTE4</i>	γ -TMT	[34]
	<i>VTE5</i>	Phytol kinase	[32]
	<i>VTE6</i>	Phytyl-P kinase	[33]
	<i>HGGT</i>	HGGT	[48]
Barley	<i>VTE1</i>	Tocopherol cyclase	[49]
	<i>VTE4</i>	γ -TMT	[49]
	<i>HPT-7H</i>	HPT	[37]
	<i>HGGT</i>	HGGT	[37]

Table 1. Cont.

Plant Species	Gene	Enzyme ¹	Ref.
Maize	<i>ZmVTE1</i>	Tocopherol cyclase	[28]
	<i>ZmVTE2</i>	HPT	[28]
	<i>ZmVTE3</i>	MPBQ/MGGBQ MT	[28]
	<i>ZmVTE4</i>	γ -TMT	[28]
	<i>ZmVTE5</i>	Phytol kinase	[28]
	<i>ZmHPPD</i>	HPPD	[28]
Rice	<i>OsGGR1</i>	GGR	[40]
	<i>OsGGR2</i>	GGR	[40]
	<i>OsγTMT</i>	γ -TMT	[41]
	<i>SGD1</i>	HPT	[50]
	<i>RTD1</i>	HPT	[51]
Oat	<i>HPPD (3 homo)</i>	HPPD	[38]
	<i>VTE2_3/VTE2_4</i>	HPT	[38]
	<i>VTE4_1</i>	γ -TMT	[38]

¹ HPPD: p-hydroxyphenyl pyruvic acid dioxygenase; GGR: geranylgeranyl reductase; HPT: homogentisate phytyl-transferase; MPBQ: 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol; MGGBQ: 2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinol; MT: methyltransferase; γ -TMT: γ -tocopherol methyltransferase; Phytol-P kinase: phytyl phosphate kinase; HGGT: homogentisate geranylgeranyltransferase.

2.3. Tocochromanol Composition of Major Cereal Crops

Numerous studies have addressed the tocochromanol composition in kernels of the main cereal types and analyzed the eight tocochromanol isomers, α -, β -, γ -, and δ -tocopherols and tocotrienols. Data from the most recent publications focusing on oat, wheat, barley, rice and maize kernels are gathered in Figure 3 and Table S1. Before going further in the discussion, it is important to underline that the mean values reported in Figure 3 were calculated using different published reports that considered one or a few genotypes and one or a few years of cultivation in some specific agroclimatic conditions. Considering the significant impact of environmental conditions on tocochromanol levels in cereals [52] and of the genetic background of the cultivar, these data must be taken with caution [28,36,53]. On Figure 3, it appears that all tocochromanol isomers were found in maize, oat, and rice kernels, whereas γ - and δ -tocopherols and γ -tocotrienol in wheat and β -tocopherol in barley were not detected. The highest levels of tocochromanols, 161 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry matter, were reported by Gutierrez-Gonzales et al. in oat kernels [38]. In wheat, rice, maize, and barley kernels, the highest concentration quantified were 69, 60, 41, and 32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry matter, respectively (Table S1) [52,54–56]. When considering the relative distribution between tocotrienols and tocopherols, the tocotrienol/tocopherol ratio (calculated with data presented in Figure 3 and Table S1) was close to 1 for oat indicating equivalent concentrations of tocotrienols and tocopherols and higher than 1 for rice and wheat, reaching 2.5 for barley. In contrast, maize kernels were shown to contain more than 2 times more tocopherols than tocotrienols.

The levels of each tocopherol and tocotrienol isomer quantified in whole kernels vary according to the cereal type (Figure 3). In maize kernels, γ -tocopherol, α -tocopherol, and γ -tocotrienol were the major tocochromanols, which correspond to 34, 23 and 22% of the total tocochromanols (Figure 3a), respectively, and β -tocotrienol, β -tocopherol, δ -tocotrienol, δ -tocopherol, and α -tocotrienol account for 1 to 12% of the total tocochromanol content [56–59]. A different distribution pattern was observed in small-grain cereals. In oat kernels, α -tocopherol and α -tocotrienol were the prevalent tocochromanols, representing 45% and 33% of the total tocochromanol content, respectively, followed by β -tocotrienol (13%), β -tocopherol (6%), and γ -tocopherol (2%) (Figure 3b) [60–62]. The presence of δ -tocotrienol, γ -tocotrienol, and δ -tocopherol was reported as very weak, accounting for

less than 1% of the total tocochromanol content. As for oats, the kernels contain the eight tocochromanol isomers, their distribution and concentration being, however, significantly different. In rice, the major tocochromanols are γ -tocotrienol and α -tocopherol, representing, respectively, 43% and 26% of the total tocochromanol content, followed by γ -tocopherol and α -tocotrienol. The sum of δ -tocotrienol, β -tocotrienol, β -tocopherol, and δ -tocopherol accounts for around 5% of the total rice tocochromanol content (Figure 3c) [55,61,63–66]. In barley kernels, α -tocotrienol is the main compound and accounts for almost half (48%) of the total tocochromanols [52,61,62]. Both α -tocopherol and γ -tocotrienol were estimated to account to 22 and 21% of the total tocochromanol content, respectively (Figure 3d). Regarding wheat kernels, the data reported in Figure 3e indicate that the predominant tocopherol is β -tocotrienol (50%), followed by α -tocopherol (27%) and both β -tocopherol and α -tocotrienol, each of them representing around 11% of the total tocochromanol content [52,54,61,62,67,68].

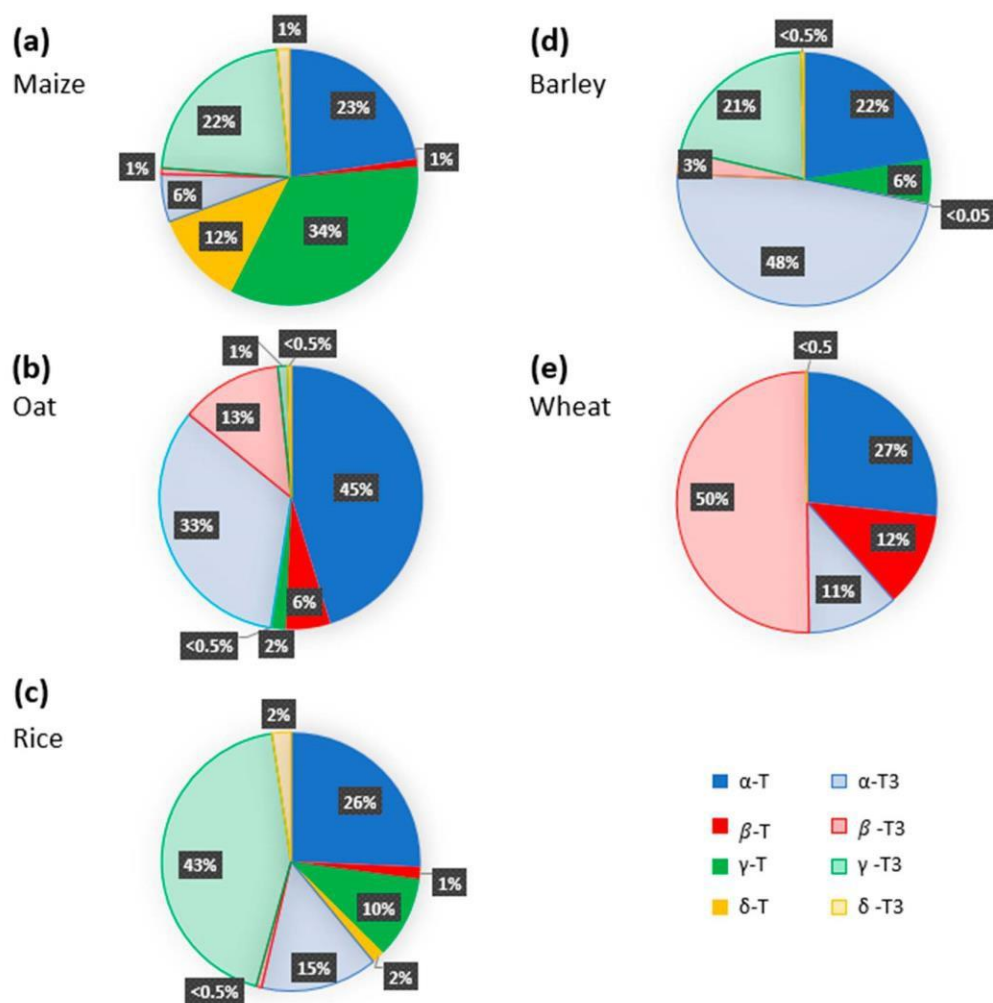


Figure 3. Tocochromanol profile of major cereal crops ((a) Maize; (b) Oat; (c) Rice; (d) Barley; (e) Wheat). The percentages were calculated using average concentration of tocochromanols reported in previously published studies [38,52,54,56–59,61–63,65–68].

2.4. Distribution of Tocochromanols within Cereal Kernels

Enzymes involved in the biosynthesis of tocopherols are located in the inner membrane of chloroplast envelope and in plastoglobuli [69]. Chloroplasts were first indicated as

the unique plant cell organelle containing tocopherols, leading to the mistaken assumption that tocopherols were only present in photosynthetic parts of plants. The occurrence of tocopherols in roots, nuts, and seeds was further evidenced [70,71]. Regarding tocotrienols, they are present in kernels of most monocotyledons, including cereals and absent in the other parts of plants as a result of the specific location of the homogentisate geranylgeranyltransferase enzyme in plastid cell of seed endosperms. Data related to the distribution of tocopherols within cereal kernels are gathered in Table 2. It clearly appears that tocopherols are primarily found in germs, representing more than 89% of the total tocopherol content; this percentage reaches 98% when considering germs of maize kernels. Moreover, as indicated in Table 2, tocotrienols are predominantly present in endosperm (up to 82% of the total tocopherol concentration) and in pericarp (up to 78%), except for maize kernels, where the pericarp contains mainly tocopherols. The major isomers found in the different parts of kernels differ depending on the considered cereal. In maize, the γ -isomers of both tocopherol and tocotrienol are predominant in all parts of kernels, with a prevalence of γ -tocopherol in the germ and pericarp (65% and 39%, respectively, of total tocopherol content) and a majority of γ -tocotrienol in the endosperm (45%) [58,72,73].

Table 2. Repartition of tocopherols in the different parts of cereal kernels.

	α -T ¹ (%)	β -T (%)	γ -T (%)	δ -T (%)	α -T3 ¹ (%)	β -T3 (%)	γ -T3 (%)	δ -T3 (%)	Total Tocopherol (%)	Total Tocotrienol (%)
Maize										
Germ	30	1	65	3	1	0	1	0	98	2
Endosperm	5	0	19	0	29	0	45	2	24	76
Pericarp	18	0	52	6	9	1	14	1	75	25
Wheat										
Germ	69	26	0	0	2	3	ND ²	0	95	5
Endosperm	5	3	13	0	11	68	ND	0	21	79
Pericarp	7	3	8	0	21	61	ND	0	18	82
Barley										
Germ	68	3	16	1	6	2	3	0	89	11
Endosperm	14	1	2	1	41	25	15	3	17	83
Pericarp	15	1	5	1	47	12	17	3	21	79
Rice										
Germ	81	3	5	0	6	ND	4	0	89	11
Endosperm	33	2	6	2	21	ND	33	4	42	58
Pericarp	37	1	4	0	27	ND	29	2	43	57

¹ T corresponds to tocopherols and T3 corresponds to tocotrienols; ² ND = not detected. The percentages reported in Table 2 correspond to the average values of distribution percentages reported in previously published reports [54,58,72–74].

In wheat germ, the α - isomer of tocopherol is the most representative tocopherol, reaching up to 68% of the total, followed by β -tocopherol (25%) and β -tocotrienol (6%). In endosperm and pericarp, β -tocotrienol is the most important tocopherol (49 and 55%, respectively), followed by γ -tocopherol in endosperm (37%) and α -tocotrienol in pericarp (21%) [54,73,74]. In barley, the α -isomers are the predominant isomers in all parts of the kernels: α -tocopherol in germ (68%) and α -tocotrienol in both endosperm and pericarp (41 and 47%) [73]. In the germ of rice kernels, α -tocopherol is largely predominant, accounting for more than 80% of the total tocopherol content. In the endosperm of rice kernels, α -tocopherol and γ -tocotrienol are equally represented (39%) followed by α -tocotrienol (21%), while in pericarp α -tocopherol is the most represented tocopherol (37%) followed by γ -tocotrienol and α -tocotrienol (29 and 27%, respectively) [73].

2.5. Kinetics of Tocopherol Accumulation during Maturation of Cereal Kernels

There are very few dynamic studies that have addressed the tocopherol composition of kernels from the early stages of kernel development until maturity. This knowledge is, however, essential to clarify which compounds fungal pathogens face at the onset of infection and to support their potential role in plant defense. In maize, several studies

corroborate an increase of tocochromanol content starting from pollination. In the report of Xie et al. [56], focusing on the first 30 days following pollination of maize, a regular increase of both tocopherol and tocotrienol was described. Increase in tocopherol content was shown to continue until 96 days after silking by Picot et al. [75]. In oat kernels, a pronounced increase in tocochromanols was reported from 14 days after anthesis to the maturity stage [60]. In barley, tocochromanols were reported to be at their highest concentration at a very early stage (milk stage) to then slightly decrease until maturity [76]. In rice, the kinetics of tocochromanol content during seed filling were significantly different between tocopherols and tocotrienols; tocopherols were reported to decrease, while an inverse tendency was described for tocotrienols [66].

3. Tocochromanols as Part of the Plant Chemical Defense Arsenal against Phytopathogenic and Toxigenic Fungi

Whereas the contribution of tocochromanols to plant protection against various abiotic stresses has been widely studied, relatively little is known regarding their potential implication in plant defense against pathogens. Moreover, the available knowledge on physiological roles of tocochromanols in plants is mainly related to tocopherols; studies on tocotrienols are much more recent, with first hypotheses on their functional role released in 2008 [77]. Comparison of tocopherol contents in control plants *versus* plants submitted to environmental stresses or use of mutants altered in their tocopherol content, has led to suggest a significant role of tocopherols in plant tolerance to drought, cold, high light, heavy metal, and salinity stress [78–81]. For a comprehensive and in-depth view of the various functions tocochromanols could play in plants, we strongly encourage readers to consult the reviews of Munné-Bosch [69] and Méné-Saffrané and DellaPenna [26]. One of the key mechanisms underlying the capacity of tocochromanols to mitigate the plant damage induced by abiotic stresses is related to their ability to scavenge or quench lipid peroxides, oxygen radicals, or singlet oxygen [82]. In addition to their antioxidant function, tocochromanols have also been suggested to interfere with cellular signaling by interacting with plant hormones (ethylene, abscisic acid, salicylic acid, and jasmonic acid) and sugar regulatory networks [80,83,84]. More recent studies have also reported a possible role of tocopherols as regulators of miRNA biogenesis, miRNA being key players in posttranscriptional regulation of gene expression during plant adaptation to stresses [85].

Though understudied, the importance of tocochromanols in plant resistance to pathogens is strongly supported by the accumulated knowledge on their role in plant protection to abiotic stresses. Indeed, biotic and abiotic stress responses cannot be dissociated, their interactions being predominantly orchestrated by plant hormones [86]. Moreover, similarly to abiotic stresses effects, biotic ones lead to an increased accumulation of ROS in plant tissues. In previously published studies addressing the involvement of plant metabolites in the mechanisms employed by crops to counteract fungal pathogens, tocochromanols are almost never mentioned [4,87]. One rationale for this could be related to the insufficient coverage of metabolomics approaches applied to decipher the chemical defense of plants that frequently excludes lipophilic compounds [4]. Nonetheless, we are convinced that tocochromanols, as part of plant protection to biotic stresses, are not receiving the attention they deserve. In the following section, the reasons why this class of compound should not be overlooked when dealing with crop resistance to fungal pathogens and more specifically to toxigenic ones is discussed. The discussed body of arguments is schematized in Figure 4.

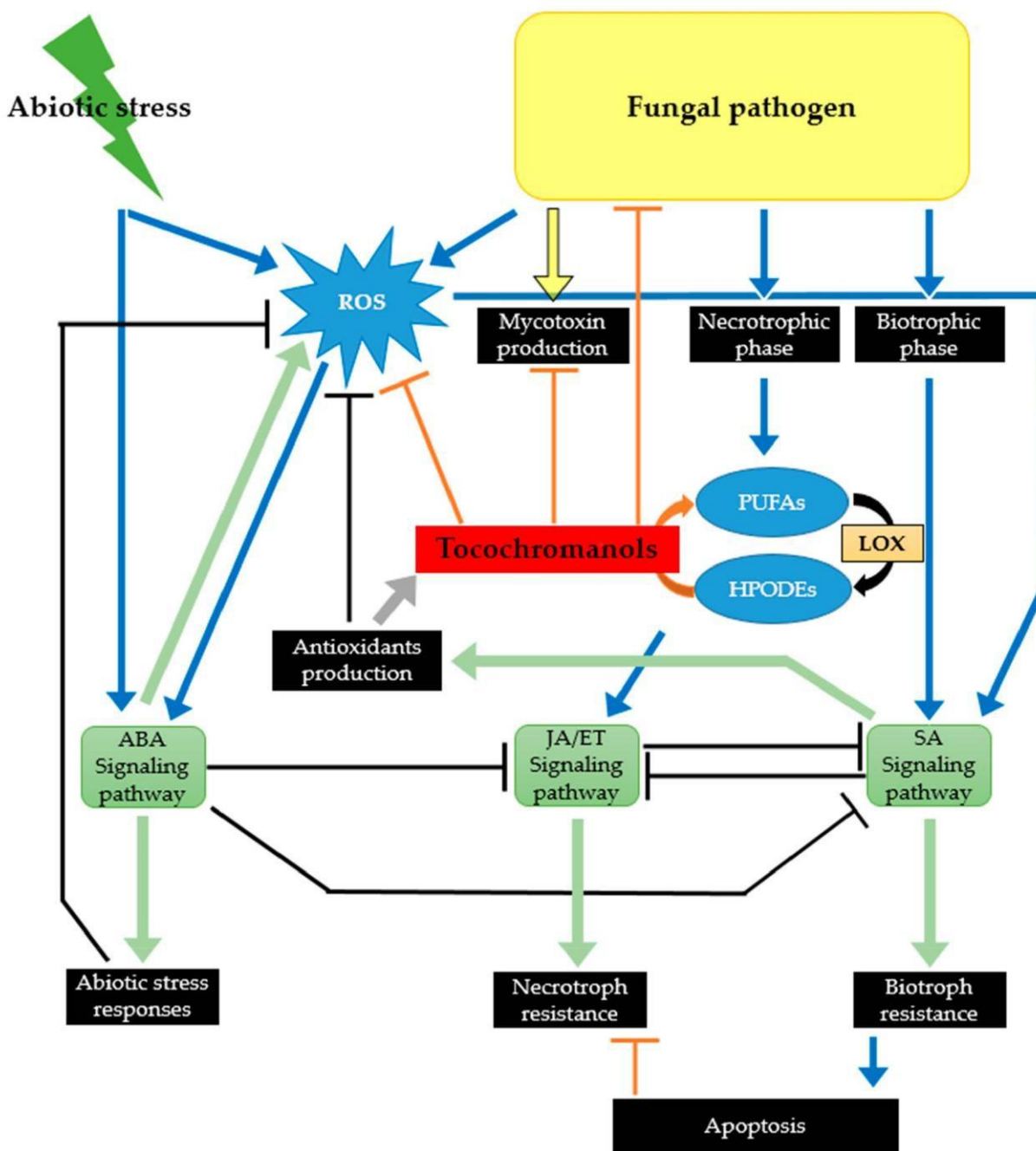


Figure 4. Involvement of tocochromanols in plant response to biotic and abiotic stresses. ROS: reactive oxygen species; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; HPODEs: hydroperoxides; LOX: lipoxygenase; ABA: abscisic acid; JA: jasmonic acid; ET: ethylene; SA: salicylic acid.

3.1. By Protecting Crops against Environmental Stresses, Tocochromanols Can Indirectly Affect Their Susceptibility to Fungal Pathogens

Environmental factors are acknowledged to modulate the interactions between plant and fungal pathogens leading to either an increase or a decrease in plant susceptibility to fungal disease, depending on the nature, timing and severity of both the environmental constraint and the pathogen [88]. The widely accepted belief that climate change will have a severe impact on the development of toxigenic fungi in crops and consequently

on the contamination of harvests with mycotoxins has led to increased research efforts on the effect of drought and temperature elevation on fungal population migration and fungal species adaptation [89], but the way climate change will affect plant–toxicogenic fungi interactions remains today largely insufficiently investigated. Hence, previous reports have suggested that wheat plants exposed to a drought stress were more susceptible to deoxynivalenol-producing *Fusarium* strains [90,91]. Similarly, contamination with aflatoxin and fumonisin mycotoxins have been reported to be worsened in maize plants cultivated under drought conditions [92,93]. Accordingly, the results of Abbas et al. [94] indicated that maize genotypes less susceptible to high temperature and drought were less prone to contamination with mycotoxins. The previous observations focusing on toxigenic fungi are supported by recent reviews published by Desaint et al. [95] and Pandey et al. [88] indicating that in half of the reported cases, temperature elevation and drought led to an increased plant susceptibility to the pathogen and/or a decrease efficacy of plant defense strategies. The molecular mechanisms underlying the negative effect of elevated temperature and drought stress on plant resistance to toxigenic fungi are not yet fully elucidated. Among probable assumptions, one can mention: (i) the role of reactive oxygen species accumulating in plant tissues in response to abiotic stresses and known to stimulate the yield of mycotoxins by toxigenic fungi [96], (ii) the role of stress-related amino acids such as asparagine or putrescine that have also been reported to promote the production of some mycotoxins [97,98], and (iii) the role of phytohormones and derived signaling pathways reported as key mediators of combined stress responses [99]. Consequently, by their capacity to mitigate oxidative stress in plant tissues and also to interfere with phytohormone regulatory networks, it is highly likely that tocochromanols can mitigate the negative impact environmental stresses can have on crop susceptibility to diseases caused by toxigenic fungi.

3.2. Tocochromanols Can Mitigate the Damage Caused by ROS Produced in Response to Infection by Toxigenic Fungal Pathogens

The key role played by ROS in plant–fungal pathogen interactions has been extensively reviewed [15,100,101]. A rapid, transient, production of huge amounts of ROS (including singlet oxygen, superoxide ions, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) is one of the earliest mechanisms of plant defense strategies against pathogens. Such an oxidative burst has been observed in wheat inoculated with a deoxynivalenol-producing *Fusarium graminearum* isolate [102,103] and, more recently, a *Fusarium culmorum* strain [104]. The evidence of increased expression of antioxidant mechanisms in maize inoculated with *Aspergillus flavus* [105] or *Fusarium verticillioides* [106] also significantly supports the occurrence of an oxidative burst following infection with these two major toxigenic fungi affecting maize crops. ROS accumulation acts as a double-edged sword in plant defense cellular processes. On one hand, ROS function as signal transducers activating local as well as systemic plant defense machinery. On the other hand, when the timing and magnitude of ROS accumulation are not tightly controlled by the plant's antioxidant system, including enzymatic and non-enzymatic components, ROS can lead to cellular damage such as the degradation of membrane lipids, proteins, and DNA and ultimately to cellular death. Such necrosis of plant tissues can increase host susceptibility to necrotrophic fungi that feed from dead plant material and include most of the toxigenic fungi–infecting crops. Indeed, the main aflatoxin producing species, i.e., *A. flavus* and *Aspergillus parasiticus*, are recognized as necrotrophic fungal agents [107]. In addition, the infection strategy of *Fusarium* species capable of producing mycotoxins, including *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, and *Fusarium proliferatum*, is also characterized by the occurrence of a necrotrophic phase. Actually, toxigenic *Fusarium* species are hemi-biotrophic fungi: they first infect living plant tissues as biotrophs but after a short latency period switch to necrotrophic growth [108]. Moreover, there is converging evidence indicating that the redox balance is a key factor regulating the mycotoxin biosynthesis and that exposure to ROS triggers and/or increases the production of mycotoxins by fungi (reviewed in Montibus et al. [109] and Gil-Serna

et al. [110]). All together, the aforementioned data indicate that ROS-overproduction, triggered by the infection by toxigenic fungi as an early plant defense mechanism, could in fact be used by the fungal pathogen to its own benefit. To cope with oxidative stress, plants have evolved diverse enzymatic and non-enzymatic machineries. In addition to specialized metabolites such as carotenoids and flavonoids, tocochromanols, which act cooperatively with ascorbate and glutathione, are acknowledged as key components of the plant antioxidant non-enzymatic machinery [111]. The capacity of tocochromanols to scavenge excess ROS and, in particular, singlet oxygen has been extensively studied [112]. For a detailed view on the structural determinants but also on the physical and chemical mechanisms involved in singlet oxygen quenching by tocochromanols, we strongly encourage the reader to read the review of Kamal-Eldin and Appelqvist [17]. Therefore, by contributing to alleviate ROS levels surrounding invasive hyphae during plant infection, tocochromanols are likely to mitigate the positive control exerted by oxidative stress on toxigenic fungal development and mycotoxin production.

3.3. Tocochromanols Can Interfere with Fatty Acid Metabolism and Consequently with Plant Signaling Networks

The major phytohormones are abscisic acid, auxin, brassinosteroids, cytokinins, gibberellins, ethylene, jasmonic acid, salicylic acid, and strigolactones. Among these, jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene are known to play central roles in orchestrating plant defense responses against various pathogens [113,114]. Even though these three phytohormones intimately interact, the salicylic acid signaling pathway is mainly associated with activation of defense response against biotrophic and hemi-biotrophic fungal pathogens, whereas the jasmonic acid and ethylene signaling pathways are mostly involved in defense against necrotrophic fungi [113]. Salicylic and jasmonic acids have been reported to significantly and positively contribute to wheat resistance to the hemi-biotrophic *F. graminearum* pathogen, while ethylene was associated with wheat susceptibility [115]. According to Makandar et al. [116], the role of the jasmonate signaling pathway in the interaction of wheat with *F. graminearum* is more contrasted: jasmonic acid could promote disease by constraining the salicylic acid signaling pathway during the early biotrophic stage of infection and promote resistance during the later necrotrophic stage. Involvement of jasmonic acid and methyl jasmonate in resistance to deoxynivalenol-producing *Fusarium* isolates has been evidenced by the comparison of *Fusarium*-inoculated and mock-inoculated wheat ear metabolomic profiles [4] and corroborated by transcriptional studies [115,117]. Moreover, according to Gunnaiah et al. [118], deoxynivalenol application on wheat tissue also led to an induction of jasmonate signaling. The key contribution of jasmonic and salicylic acid to plant resistance to toxigenic fungi has also been suggested for maize and various toxigenic fungal pathogens, including the fumonisin producer *F. verticillioides* [119] and the aflatoxin producing *A. flavus* species [120]. The expression of a wide set of defense genes has been shown to be regulated by jasmonic acid and methyl jasmonate, including genes related to specialized metabolites pathways such as phenylpropanoids or terpenoids, genes coding for defensive proteins (pathogenesis-related or PR proteins), and genes related to redox homeostasis [121]. Jasmonic acid signaling has also been reported to influence callose deposition, which in wheat is a key mechanism dampening *F. graminearum* spread within the ear [122]. Moreover, external application of jasmonic acid has been shown to activate glucosyltransferase in barley [123], which is a key enzyme activity involved in a deoxynivalenol detoxification pathway that transforms the toxin into the less phytotoxic deoxynivalenol-3-O-glucoside. Jasmonic acid belongs to the family of oxylipins that gathers lipophilic signaling molecules derived from the oxidation of polyunsaturated fatty acids. In fact, jasmonic acid is synthesized from α -linolenic acid (18:3) following a process of oxidation, cyclisation and acyl chain shortening [121]. The first step of its biosynthetic pathway is the conversion of α -linolenic acid to 13-hydroperoxylinolenic acid by a 13-lipoxygenase. Considering the widely acknowledged capacity of tocochromanols to scavenge lipid peroxyl radicals and lower the extent of lipid peroxidation [84,124] but also

their potential to affect lipoxygenase activity through competitive inhibition [125,126], it is more than likely that tocochromanols can negatively affect the biosynthesis of jasmonic acid and, in consequence, modulate the jasmonic acid-mediated response of plants. Similarly, tocochromanols are theoretically able to reduce the amounts of other lipid oxidation products such as those derived from the action of 9-lipoxygenase that, even though less studied, could also be key players of plant response to fungal attacks. In several studies, products generated by 9-lipoxygenase were suggested to contribute to the susceptibility of the plant host. Thus, Gao et al. [127] observed an increased susceptibility of maize to *A. flavus* and *Aspergillus nidulans* but also to *F. verticillioides* in maize mutant lines in which the function of a 9-lipoxygenase gene was abolished. A similar conclusion was raised by Nalam et al. [128] who observed that the silencing of a gene coding for a 9-lipoxygenase in wheat led to an enhanced susceptibility to *F. graminearum*. The oxylipin-mediated crosstalk between plant host and toxigenic fungi has been the subject of extensive research during the two past decades. There has been growing evidence that oxylipins can modulate spore production, fungal development, reproduction and secondary metabolites biosynthesis [127,129,130]. Investigations focusing on the biosynthesis of aflatoxins and fumonisins have demonstrated the opposite effect of 13-lipoxygenase and 9-lipoxygenase oxidation products (recently reviewed in Qiu et al. [131]). Whereas fatty acid hydroperoxides generated through the 9-lipoxygenase pathway were shown to mimic the fungal oxylipins called psi factors for precocious sexual inducers and promote the production of mycotoxins, products derived from the action of 13-lipoxygenase exhibited a significant inhibitor effect [132,133]. Less is known regarding the effect of oxylipins on the production of deoxynivalenol by *F. graminearum* and *F. culmorum*. The hypothesis that 9-lipoxygenase hydroperoxides could be toxin-conducive factors in wheat raised by Nobili et al. [133] and Nalam et al. [128] requires still to be demonstrated. Lastly, as highlighted for *F. verticillioides* [134], oxylipins derived from additional lipoxygenase pathways such as those related to the 3, 4 and 5-lipoxygenase in maize are also strongly suspected to interfere with fungal colonization and its production of mycotoxins.

3.4. Tocochromanols Display Antifungal and Antimycotoxin Activities

As lipophilic components, tocochromanols are thought to induce perturbations in the membrane of microorganisms, to possibly disrupt its integrity and affect the cell survival. This bioactivity has been mainly studied against bacteria pathogenic to humans. The capacity of α -tocopherol to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* was reported by Andrade et al. [135] and supported by the characterization of the antimicrobial activity of *Codonopsis lanceolate* plants enriched in α -tocopherol through overexpression of the γ -tocopherol methyltransferase [136]. Regarding fungal pathogens, very few studies have investigated the effect of tocochromanols on the growth of toxigenic fungi and mycotoxin production. Most of the arguments that substantiate the hypothesis of an antifungal or/and an antimycotoxin effect comes from studies investigating the relationships between the bioactivity of plant extracts and their richness in tocochromanols [137,138]. To our knowledge, the only studies addressing the direct effect of tocochromanols on mycotoxin yield are the reports of Norton [139] and Picot et al. [75]. The results of the two previous studies showed, however, high discrepancies; while aflatoxin and *A. flavus* growth were not affected by supplementation with α - and γ -tocopherols, at concentrations ranging from 0.05 to 5 mM [139,140], a significant inhibition of the production of fumonisins by *F. verticillioides* was induced by 0.01 mM of α -tocopherol [75]. These inconsistencies clearly show the need to deepen the investigation of tocochromanol bioactivity against toxigenic fungi.

4. Conclusions

To cope with fungal pathogens, cereals have developed a variety of biochemical responses to avoid infection and reduce adverse effects, including the contamination of ears with mycotoxins. Whereas numerous reports have appeared in the scientific literature

over the past several years regarding the role of phenylpropanoids and terpenoids in plant chemical defense, the potential contribution of tocochromanols has been scarcely addressed. Yet, as emphasized by the information compiled in the present review, tocochromanols are widely distributed in cereals, and there are strong arguments in favor of a pivotal role played by these compounds. These arguments include: (i) their capacity to alleviate ROS-induced oxidative damage, (ii) their capacity to interfere with plant hormone signaling pathways, and (iii) their potential to reduce fungal growth and mycotoxin yield. An exciting challenge for the near future is therefore to validate this hypothesis as this could open the way to help breeders to select cereal genotypes less susceptible to contamination with mycotoxins and ensure the safety of harvests. The currently available knowledge regarding the biosynthetic pathway of tocochromanols and associated genes will be a significant asset to foster scientific research on the way tocochromanols assist cereals to combat toxigenic fungi.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23169303/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, J.-M.S. and F.R.-F.; writing—original draft: J.-M.S. and F.R.-F.; writing—editing and reviewing: V.A., S.C., and V.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by a collaborative project involving INRAE and Syngenta (grant agreement 22001389-00004520).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. OECD Agriculture Statistics. Available online: https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/data/oecd-agriculture-statistics_agr-data-en (accessed on 27 June 2022).
2. Savary, S.; Willocquet, L.; Pethybridge, S.J.; Esker, P.; McRoberts, N.; Nelson, A. The Global Burden of Pathogens and Pests on Major Food Crops. *Nat. Ecol. Evol.* **2019**, *3*, 430–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zaynab, M.; Mahpara, F.; Safdar, A.; Yasir, S.; Muhammad, U.; Muhammad, H.Z.; Khalida, B. Role of Secondary Metabolites in Plant Defense against Pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 198–202. [[CrossRef](#)]
4. Gauthier, L.; Atanasova-Penichon, V.; Chéreau, S.; Richard-Forget, F. Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium Graminearum* and Deoxynivalenol Accumulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 24839–24872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. *Plant Sci.* **2012**, *196*, 67–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vincenzo, L.; Veronica, M.T.L.; Angela, C. Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants against Fungal Pathogens and Insects. In *Phytochemistry: Advances in Research*; Imperato, F., Ed.; Research Signpost: Trivandrum, Kerala, 2006; ISBN 978-81-308-0034-9.
7. Sattler, S.E.; Funnell-Harris, D.L. Modifying Lignin to Improve Bioenergy Feedstocks: Strengthening the Barrier against Pathogens? *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Atanasova-Penichon, V.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to *Fusarium* and Mycotoxin Accumulation. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 566. [[CrossRef](#)]
9. Bollina, V.; Kushalappa, A.C.; Choo, T.M.; Dion, Y.; Rioux, S. Identification of Metabolites Related to Mechanisms of Resistance in Barley against *Fusarium Graminearum*, Based on Mass Spectrometry. *Plant Mol. Biol.* **2011**, *77*, 355. [[CrossRef](#)]
10. Boncan, D.A.T.; Tsang, S.S.K.; Li, C.; Lee, I.H.T.; Lam, H.-M.; Chan, T.-F.; Hui, J.H.L. Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7382. [[CrossRef](#)]
11. Abbas, F.; Ke, Y.; Yu, R.; Yue, Y.; Amanullah, S.; Jahangir, M.M.; Fan, Y. Volatile Terpenoids: Multiple Functions, Biosynthesis, Modulation and Manipulation by Genetic Engineering. *Planta* **2017**, *246*, 803–816. [[CrossRef](#)]
12. Schmelz, E.A.; Huffaker, A.; Sims, J.W.; Christensen, S.A.; Lu, X.; Okada, K.; Peters, R.J. Biosynthesis, Elicitation and Roles of Monocot Terpenoid Phytoalexins. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **2014**, *79*, 659–678. [[CrossRef](#)]
13. Mauch-Mani, B.; Mauch, F. The Role of Abscisic Acid in Plant–Pathogen Interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, *8*, 408–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Robert-Seilaniantz, A.; Navarro, L.; Bari, R.; Jones, J.D. Pathological Hormone Imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2007**, *10*, 372–379. [[CrossRef](#)]
15. Dumanović, J.; Nepovimova, E.; Natić, M.; Kuča, K.; Jačević, V. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, 552969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Santos, L.; Kasper, R.; Gil-Serna, J.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. Effect of Capsicum Carotenoids on Growth and Ochratoxin A Production by Chilli and Paprika *Aspergillus* Spp. Isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *142*, 354–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kamal-Eldin, A.; Appelqvist, L.-Å. The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. *Lipids* **1996**, *31*, 671–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hernández, I.; Alegre, L.; Munné-Bosch, S. Drought-Induced Changes in Flavonoids and Other Low Molecular Weight Antioxidants in *Cistus Clusii* Grown under Mediterranean Field Conditions. *Tree Physiol.* **2004**, *24*, 1303–1311. [[CrossRef](#)]
19. Chennupati, P.; Seguin, P.; Liu, W. Effects of High Temperature Stress at Different Development Stages on Soybean Isoflavone and Tocopherol Concentrations. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 13081–13088. [[CrossRef](#)]
20. Kodad, O.; Socias i Company, R.; Alonso, J.M. Genotypic and Environmental Effects on Tocopherol Content in Almond. *Antioxidants* **2018**, *9*, 6. [[CrossRef](#)]
21. Xiang, N.; Li, C.; Li, G.; Yu, Y.; Hu, J.; Guo, X. Comparative Evaluation on Vitamin E and Carotenoid Accumulation in Sweet Corn (*Zea mays* L.) Seedlings under Temperature Stress. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 9772–9781. [[CrossRef](#)]
22. Asensi-Fabado, M.A.; Ammon, A.; Sonnewald, U.; Munné-Bosch, S.; Voll, L.M. Tocopherol Deficiency Reduces Sucrose Export from Salt-Stressed Potato Leaves Independently of Oxidative Stress and Symplastic Obstruction by Callose. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 957–971. [[CrossRef](#)]
23. Kruk, J.; Holländer-Czytko, H.; Oettmeier, W.; Trebst, A. Tocopherol as Singlet Oxygen Scavenger in Photosystem II. *J. Plant Physiol.* **2005**, *162*, 749–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Muñoz, P.; Munné-Bosch, S. Vitamin E in Plants: Biosynthesis, Transport, and Function. *Trends Plant Sci.* **2019**, *24*, 1040–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V. Comparative Antioxidant Activities of Carotenoids Measured by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), ABTS Bleaching Assay (ATEAC), DPPH Assay and Peroxyl Radical Scavenging Assay. *Food Chem.* **2011**, *129*, 139–148. [[CrossRef](#)]
26. Mène-Saffrané, L.; DellaPenna, D. Biosynthesis, Regulation and Functions of Tocochromanols in Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48*, 301–309. [[CrossRef](#)]
27. Hussain, N.; Irshad, F.; Jabeen, Z.; Shamsi, I.H.; Li, Z.; Jiang, L. Biosynthesis, Structural, and Functional Attributes of Tocopherols in Planta; Past, Present, and Future Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 6137–6149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lipka, A.E.; Gore, M.A.; Magallanes-Lundback, M.; Mesberg, A.; Lin, H.; Tiede, T.; Chen, C.; Buell, C.R.; Buckler, E.S.; Rocheford, T.; et al. Genome-Wide Association Study and Pathway-Level Analysis of Tocochromanols Levels in Maize Grain. *G3 GenesGenomes-Genetics* **2013**, *3*, 1287–1299. [[CrossRef](#)]
29. Fritsche, S.; Wang, X.; Jung, C. Recent Advances in Our Understanding of Tocopherol Biosynthesis in Plants: An Overview of Key Genes, Functions, and Breeding of Vitamin E Improved Crops. *Antioxidants* **2017**, *6*, 99. [[CrossRef](#)]
30. Ma, J.; Qiu, D.; Pang, Y.; Gao, H.; Wang, X.; Qin, Y. Diverse Roles of Tocopherols in Response to Abiotic and Biotic Stresses and Strategies for Genetic Biofortification in Plants. *Mol. Breed.* **2020**, *40*, 18. [[CrossRef](#)]
31. Mène-Saffrané, L. Vitamin E Biosynthesis and Its Regulation in Plants. *Antioxidants* **2017**, *7*, 2. [[CrossRef](#)]
32. Valentin, H.E.; Lincoln, K.; Moshiri, F.; Jensen, P.K.; Qi, Q.; Venkatesh, T.V.; Karunananda, B.; Baszis, S.R.; Norris, S.R.; Savidge, B.; et al. The Arabidopsis Vitamin E Pathway Gene5-1 Mutant Reveals a Critical Role for Phytol Kinase in Seed Tocopherol Biosynthesis. *Plant Cell* **2006**, *18*, 212–224. [[CrossRef](#)]
33. Vom Dorp, K.; Hölzl, G.; Plohm, C.; Eisenhut, M.; Abraham, M.; Weber, A.P.; Hanson, A.D.; Dörmann, P. Remobilization of Phytol from Chlorophyll Degradation Is Essential for Tocopherol Synthesis and Growth of Arabidopsis. *Plant Cell* **2015**, *27*, 2846–2859. [[CrossRef](#)]
34. Bergmüller, E.; Porfirova, S.; Dörmann, P. Characterization of an Arabidopsis Mutant Deficient in γ -Tocopherol Methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* **2003**, *52*, 1181–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Porfirova, S.; Bergmüller, E.; Töpf, S.; Lemke, R.; Dörmann, P. Isolation of an Arabidopsis Mutant Lacking Vitamin E and Identification of a Cyclase Essential for All Tocopherol Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12495–12500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Diepenbrock, C.H.; Kandianis, C.B.; Lipka, A.E.; Magallanes-Lundback, M.; Vaillancourt, B.; Góngora-Castillo, E.; Wallace, J.G.; Cepela, J.; Mesberg, A.; Bradbury, P.J.; et al. Novel Loci Underlie Natural Variation in Vitamin E Levels in Maize Grain. *Plant Cell* **2017**, *29*, 2374–2392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schuy, C.; Groth, J.; Ammon, A.; Eydam, J.; Baier, S.; Schweizer, G.; Hanemann, A.; Herz, M.; Voll, L.M.; Sonnewald, U. Deciphering the Genetic Basis for Vitamin E Accumulation in Leaves and Grains of Different Barley Accessions. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9470. [[CrossRef](#)]
38. Gutierrez-Gonzalez, J.J.; Garvin, D.F. Subgenome-Specific Assembly of Vitamin E Biosynthesis Genes and Expression Patterns during Seed Development Provide Insight into the Evolution of Oat Genome. *Plant Biotechnol. J.* **2016**, *14*, 2147–2157. [[CrossRef](#)]
39. Chaudhary, N.; Khurana, P. Vitamin E Biosynthesis Genes in Rice: Molecular Characterization, Expression Profiling and Comparative Phylogenetic Analysis. *Plant Sci.* **2009**, *177*, 479–491. [[CrossRef](#)]

40. Kimura, E.; Abe, T.; Murata, K.; Kimura, T.; Otoki, Y.; Yoshida, T.; Miyazawa, T.; Nakagawa, K. Identification of OsGGR2, a Second Geranylgeranyl Reductase Involved in α -Tocopherol Synthesis in Rice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1870. [[CrossRef](#)]
41. Wang, X.-Q.; Yoon, M.-Y.; He, Q.; Kim, T.-S.; Tong, W.; Choi, B.-W.; Lee, Y.-S.; Park, Y.-J. Natural Variations in Os γ TMT Contribute to Diversity of the α -Tocopherol Content in Rice. *Mol. Genet. Genom.* **2015**, *290*, 2121–2135. [[CrossRef](#)]
42. Tanaka, R.; Rothbart, M.; Oka, S.; Takabayashi, A.; Takahashi, K.; Shibata, M.; Myouga, F.; Motohashi, R.; Shinozaki, K.; Grimm, B.; et al. LIL3, a Light-Harvesting-like Protein, Plays an Essential Role in Chlorophyll and Tocopherol Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16721–16725. [[CrossRef](#)]
43. Zhan, W.; Liu, J.; Pan, Q.; Wang, H.; Yan, S.; Li, K.; Deng, M.; Li, W.; Liu, N.; Kong, Q.; et al. An Allele of ZmPORB2 Encoding a Protochlorophyllide Oxidoreductase Promotes Tocopherol Accumulation in Both Leaves and Kernels of Maize. *Plant J.* **2019**, *100*, 114–127. [[CrossRef](#)]
44. Wang, H.; Xu, S.; Fan, Y.; Liu, N.; Zhan, W.; Liu, H.; Xiao, Y.; Li, K.; Pan, Q.; Li, W.; et al. Beyond Pathways: Genetic Dissection of Tocopherol Content in Maize Kernels by Combining Linkage and Association Analyses. *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 1464–1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Norris, S.R.; Shen, X.; Della Penna, D. Complementation of the Arabidopsis Pds1 Mutation with the Gene Encoding P-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 1317–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Keller, Y.; Bouvier, F.; d’Harlingue, A.; Camara, B. Metabolic Compartmentation of Plastid Prenylipid Biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 413–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cheng, Z.; Sattler, S.; Maeda, H.; Sakuragi, Y.; Bryant, D.A.; DellaPenna, D. Highly Divergent Methyltransferases Catalyze a Conserved Reaction in Tocopherol and Plastoquinone Synthesis in Cyanobacteria and Photosynthetic Eukaryotes. *Plant Cell* **2003**, *15*, 2343–2356. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, C.; Cahoon, R.E.; Hunter, S.C.; Chen, M.; Han, J.; Cahoon, E.B. Genetic and Biochemical Basis for Alternative Routes of Tocotrienol Biosynthesis for Enhanced Vitamin E Antioxidant Production. *Plant J.* **2013**, *73*, 628–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Graebner, R.C.; Wise, M.; Cuesta-Marcos, A.; Geniza, M.; Blake, T.; Blake, V.C.; Butler, J.; Chao, S.; Hole, D.J.; Horsley, R.; et al. Quantitative Trait Loci Associated with the Tocochromanol (Vitamin E) Pathway in Barley. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133767. [[CrossRef](#)]
50. Wang, D.; Wang, Y.; Long, W.; Niu, M.; Zhao, Z.; Teng, X.; Zhu, X.; Zhu, J.; Hao, Y.; Wang, Y.; et al. SGD1, a Key Enzyme in Tocopherol Biosynthesis, Is Essential for Plant Development and Cold Tolerance in Rice. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **2017**, *260*, 90–100. [[CrossRef](#)]
51. Yunhui, Z.; Kai, L.; Xiaomei, Z.; Yan, W.; Suobing, Z.; Haiyuan, C.; Jing, L.; Yingjie, W.; Xianwen, F. Rice Tocopherol Deficiency 1 Encodes a Homogentisate Phytlyltransferase Essential for Tocopherol Biosynthesis and Plant Development in Rice. *Plant Cell Rep.* **2018**, *37*, 775–787.
52. Lachman, J.; Hejtmánková, A.; Orsák, M.; Popov, M.; Martinek, P. Tocotrienols and Tocopherols in Colored-Grain Wheat, Triticum and Barley. *Food Chem.* **2018**, *240*, 725–735. [[CrossRef](#)]
53. Sookwong, P.; Murata, K.; Nakagawa, K.; Shibata, A.; Kimura, T.; Yamaguchi, M.; Kojima, Y.; Miyazawa, T. Cross-Fertilization for Enhancing Tocotrienol Biosynthesis in Rice Plants and QTL Analysis of Their F2 Progenies. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4620–4625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hidalgo, A.; Brandolini, A. Protein, Ash, Lutein and Tocols Distribution in Einkorn (*Triticum monococcum* L. Subsp. *Monococcum*) Seed Fractions. *Food Chem.* **2008**, *107*, 444–448. [[CrossRef](#)]
55. Goufo, P.; Trindade, H. Rice Antioxidants: Phenolic Acids, Flavonoids, Anthocyanins, Proanthocyanidins, Tocopherols, Tocotrienols, γ -Oryzanol, and Phytic Acid. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 75–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Xie, L.; Yu, Y.; Mao, J.; Liu, H.; Hu, J.; Li, T.; Guo, X.; Liu, R. Evaluation of Biosynthesis, Accumulation and Antioxidant Activity of Vitamin E in Sweet Corn (*Zea mays* L.) during Kernel Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2780. [[CrossRef](#)]
57. Kurilich, A.C.; Juvik, J.A. Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1948–1955. [[CrossRef](#)]
58. Sun, X.; Ma, L.; Lux, P.E.; Wang, X.; Stuetz, W.; Frank, J.; Liang, J. The Distribution of Phosphorus, Carotenoids and Tocochromanols in Grains of Four Chinese Maize (*Zea mays* L.) Varieties. *Food Chem.* **2022**, *367*, 130725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Franzen, J.; Haaß, M.M. Vitamin E Content during Development of Some Seedlings. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2911–2913. [[CrossRef](#)]
60. Gutierrez-Gonzalez, J.J.; Wise, M.L.; Garvin, D.F. A Developmental Profile of Tocol Accumulation in Oat Seeds. *J. Cereal Sci.* **2013**, *57*, 79–83. [[CrossRef](#)]
61. Horvath, G.; Wessjohann, L.; Bigirimana, J.; Jansen, M.; Guisez, Y.; Caubergs, R.; Horemans, N. Differential Distribution of Tocopherols and Tocotrienols in Photosynthetic and Non-Photosynthetic Tissues. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1185–1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zieliński, H.; Ciska, E.; Kozłowska, H. The Cereal Grains: Focus on Vitamin E. *Czech J. Food Sci.* **2001**, *19*, 182–188. [[CrossRef](#)]
63. Yu, L.; Li, G.; Li, M.; Xu, F.; Beta, T.; Bao, J. Genotypic Variation in Phenolic Acids, Vitamin E and Fatty Acids in Whole Grain Rice. *Food Chem.* **2016**, *197*, 776–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bergman, C.J.; Xu, Z. Genotype and Environment Effects on Tocopherol, Tocotrienol, and γ -Oryzanol Contents of Southern U.S. Rice. *Cereal Chem.* **2003**, *80*, 446–449. [[CrossRef](#)]
65. Heinemann, R.J.B.; Xu, Z.; Godber, J.S.; Lanfer-Marquez, U.M. Tocopherols, Tocotrienols, and γ -Oryzanol Contents in Japonica and Indica Subspecies of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivated in Brazil. *Cereal Chem.* **2008**, *85*, 243–247. [[CrossRef](#)]

66. Kim, N.H.; Kwak, J.; Baik, J.Y.; Yoon, M.-R.; Lee, J.-S.; Yoon, S.W.; Kim, I.-H. Changes in Lipid Substances in Rice during Grain Development. *Phytochemistry* **2015**, *116*, 170–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lampi, A.-M.; Nurmi, T.; Ollilainen, V.; Piironen, V. Tocopherols and Tocotrienols in Wheat Genotypes in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9716–9721. [[CrossRef](#)]
68. Labuschagne, M.; Mkhatywa, N.; Johansson, E.; Wentzel, B.; van Biljon, A. The Content of Tocols in South African Wheat; Impact on Nutritional Benefits. *Foods* **2017**, *6*, 95. [[CrossRef](#)]
69. Munne-Bosch, S. The Role of alpha-Tocopherol in Plant Stress Tolerance. *J. Plant Physiol.* **2005**, *162*, 743–748. [[CrossRef](#)]
70. Fisk, I.D.; White, D.A.; Carvalho, A.; Gray, D.A. Tocopherol—An Intrinsic Component of Sunflower Seed Oil Bodies. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 341–344. [[CrossRef](#)]
71. Siles, L.; Cela, J.; Munne-Bosch, S. Vitamin E Analyses in Seeds Reveal a Dominant Presence of Tocotrienols over Tocopherols in the Arecaceae Family. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 207–214. [[CrossRef](#)]
72. Grams, G.W.; Blessin, C.W.; Inglett, G.E. Distribution of Tocopherols within the Corn Kernel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1970**, *47*, 337–339. [[CrossRef](#)]
73. Ko, S.-N.; Kim, C.-J.; Kim, H.; Kim, C.-T.; Chung, S.-H.; Tae, B.-S.; Kim, I.-H. Tocol Levels in Milling Fractions of Some Cereal Grains and Soybean. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80*, 585–589. [[CrossRef](#)]
74. Morrison, W.R.; Coventry, A.M.; Barnes, P.J. The Distribution of Acyl Lipids and Tocopherols in Flours Millstreams. *J. Sci. Food Agric.* **1982**, *33*, 925–933. [[CrossRef](#)]
75. Picot, A.; Atanasova-Pénichon, V.; Pons, S.; Marchegay, G.; Barreau, C.; Pinson-Gadais, L.; Roucolle, J.; Daveau, F.; Caron, D.; Richard-Forget, F. Maize Kernel Antioxidants and Their Potential Involvement in Fusarium Ear Rot Resistance. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3389–3395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Falk, J.; Krahnstöver, A.; van der Kooij, T.A.W.; Schlenkog, M.; Krupinska, K. Tocopherol and Tocotrienol Accumulation during Development of Caryopses from Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2977–2985. [[CrossRef](#)]
77. Matringe, M.; Ksas, B.; Rey, P.; Havaux, M. Tocotrienols, the Unsaturated Forms of Vitamin E, Can Function as Antioxidants and Lipid Protectors in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 764–778. [[CrossRef](#)]
78. Kim, S.-E.; Lee, C.-J.; Ji, C.Y.; Kim, H.S.; Park, S.-U.; Lim, Y.-H.; Park, W.S.; Ahn, M.-J.; Bian, X.; Xie, Y.; et al. Transgenic Sweetpotato Plants Overexpressing Tocopherol Cyclase Display Enhanced α -Tocopherol Content and Abiotic Stress Tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *144*, 436–444. [[CrossRef](#)]
79. Spicher, L.; Almeida, J.; Gutbrod, K.; Pipitone, R.; Dörmann, P.; Glauser, G.; Rossi, M.; Kessler, F. Essential Role for Phytol Kinase and Tocopherol in Tolerance to Combined Light and Temperature Stress in Tomato. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 5845–5856. [[CrossRef](#)]
80. Cela, J.; Chang, C.; Munne-Bosch, S. Accumulation of G- Rather than a-Tocopherol Alters Ethylene Signaling Gene Expression in the Vte4 Mutant of Arabidopsis Thaliana. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52*, 1389–1400. [[CrossRef](#)]
81. Maeda, H.; Song, W.; Sage, T.L.; DellaPenna, D. Tocopherols Play a Crucial Role in Low-Temperature Adaptation and Phloem Loading in Arabidopsis. *Plant Cell* **2006**, *18*, 2710–2732. [[CrossRef](#)]
82. Chapman, J.M.; Muhlemann, J.K.; Gayomba, S.R.; Muday, G.K. RBOH-Dependent ROS Synthesis and ROS Scavenging by Plant Specialized Metabolites To Modulate Plant Development and Stress Responses. *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 370–396. [[CrossRef](#)]
83. Mène-Saffrané, L.; Jones, A.D.; DellaPenna, D. Plastochromanol-8 and Tocopherols Are Essential Lipid-Soluble Antioxidants during Seed Desiccation and Quiescence in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17815–17820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Munne-Bosch, S.; Weiler, E.W.; Alegre, L.; Müller, M.; Düchting, P.; Falk, J. A-Tocopherol May Influence Cellular Signaling by Modulating Jasmonic Acid Levels in Plants. *Planta* **2007**, *225*, 681–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Fang, X.; Zhao, G.; Zhang, S.; Li, Y.; Gu, H.; Li, Y.; Zhao, Q.; Qi, Y. Chloroplast-to-Nucleus Signaling Regulates MicroRNA Biogenesis in Arabidopsis. *Dev. Cell* **2019**, *48*, 371–382.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Atkinson, N.J.; Urwin, P.E. The Interaction of Plant Biotic and Abiotic Stresses: From Genes to the Field. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 3523–3543. [[CrossRef](#)]
87. Balmer, D.; Flors, V.; Glauser, G.; Mauch-Mani, B. Metabolomics of Cereals under Biotic Stress: Current Knowledge and Techniques. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 82. [[CrossRef](#)]
88. Pandey, P.; Irulappan, V.; Bagavathiannan, M.V.; Senthil-Kumar, M. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-Morphological Traits. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 537. [[CrossRef](#)]
89. Perrone, G.; Ferrara, M.; Medina, A.; Pascale, M.; Magan, N. Toxigenic Fungi and Mycotoxins in a Climate Change Scenario: Ecology, Genomics, Distribution, Prediction and Prevention of the Risk. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1496. [[CrossRef](#)]
90. Papendick, R.; Cook, R. Plant water stress and development of Fusarium foot rot in Wheat Subjected to Different Cultural Practices. *Phytopathology* **1974**, *64*, 358–363. [[CrossRef](#)]
91. Wildermuth, G.B.; Morgan, J.M. Genotypic Differences in Partial Resistance to Crown Rot Caused by Fusarium Pseudograminearum in Relation to an Osmoregulation Gene in Wheat. *Australas. Plant Pathol.* **2004**, *33*, 121–123. [[CrossRef](#)]
92. Guo, B.; Chen, Z.-Y.; Lee, R.D.; Scully, B.T. Drought Stress and Preharvest Aflatoxin Contamination in Agricultural Commodity: Genetics, Genomics and Proteomics. *J. Integr. Plant Biol.* **2008**, *50*, 1281–1291. [[CrossRef](#)]
93. Vaughan, M.M.; Huffaker, A.; Schmelz, E.A.; Dafeo, N.J.; Christensen, S.A.; McAuslane, H.J.; Alborn, H.T.; Allen, L.H.; Teal, P.E.A. Interactive Effects of Elevated [CO₂] and Drought on the Maize Phytochemical Defense Response against Mycotoxigenic Fusarium Verticillioides. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

+

94. Abbas, H.; Mascagni, H.; Bruns, H.; Shier, W. Effect of Planting Density, Irrigation Regimes, and Maize Hybrids with Varying Ear Size on Yield, and Aflatoxin and Fumonisin Contamination Levels. *Am. J. Plant Sci.* **2012**, *3*, 1341–1354. [[CrossRef](#)]
95. Desaint, H.; Aoun, N.; Deslandes, L.; Vailleau, F.; Roux, F.; Berthomé, R. Fight Hard or Die Trying: When Plants Face Pathogens under Heat Stress. *New Phytol.* **2021**, *229*, 712–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Ferrigo, D.; Raiola, A.; Causin, R. Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules* **2016**, *21*, 627. [[CrossRef](#)]
97. Gardiner, D.M.; Kazan, K.; Praud, S.; Torney, F.J.; Rusu, A.; Manners, J.M. Early Activation of Wheat Polyamine Biosynthesis during Fusarium Head Blight Implicates Putrescine as an Inducer of Trichothecene Mycotoxin Production. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 289. [[CrossRef](#)]
98. Audenaert, K.; Vanheule, A.; Höfte, M.; Haesaert, G. Deoxynivalenol: A Major Player in the Multifaceted Response of Fusarium to Its Environment. *Toxins* **2013**, *6*, 1–19. [[CrossRef](#)]
99. Gupta, A.; Hisano, H.; Hojo, Y.; Matsuura, T.; Ikeda, Y.; Mori, I.C.; Senthil-Kumar, M. Global Profiling of Phytohormone Dynamics during Combined Drought and Pathogen Stress in Arabidopsis Thaliana Reveals ABA and JA as Major Regulators. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4017. [[CrossRef](#)]
100. Vellosillo, T.; Vicente, J.; Kulasekaran, S.; Hamberg, M.; Castresana, C. Emerging Complexity in Reactive Oxygen Species Production and Signaling during the Response of Plants to Pathogens. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 444–448. [[CrossRef](#)]
101. Baxter, A.; Mittler, R.; Suzuki, N. ROS as Key Players in Plant Stress Signalling. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 1229–1240. [[CrossRef](#)]
102. Waśkiewicz, A.; Morkunas, I.; Bednarski, W.; Mai, V.C.; Formela, M.; Beszterda, M.; Wiśniewska, H.; Goliński, P. Deoxynivalenol and Oxidative Stress Indicators in Winter Wheat Inoculated with Fusarium Graminearum. *Toxins* **2014**, *6*, 575–591. [[CrossRef](#)]
103. Desmond, O.J.; Manners, J.M.; Stephens, A.E.; Maclean, D.J.; Schenk, P.M.; Gardiner, D.M.; Munn, A.L.; Kazan, K. The Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol Elicits Hydrogen Peroxide Production, Programmed Cell Death and Defence Responses in Wheat. *Mol. Plant Pathol.* **2008**, *9*, 435–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Pastuszak, J.; Szczerba, A.; Dziurka, M.; Hornyák, M.; Kopec, P.; Szkłarczyk, M.; Płażek, A. Physiological and Biochemical Response to Fusarium Culmorum Infection in Three Durum Wheat Genotypes at Seedling and Full Anthesis Stage. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Liu, H.; Wu, H.; Wang, Y.; Wang, H.; Chen, S.; Yin, Z. Comparative Transcriptome Profiling and Co-Expression Network Analysis Uncover the Key Genes Associated With early-Stage Resistance to Aspergillus Flavus in Maize. *BMC Plant Biol.* **2021**, *21*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Lambarey, H.; Moola, N.; Veenstra, A.; Murray, S.; Suhail Rafudeen, M. Transcriptomic Analysis of a Susceptible African Maize Line to Fusarium Verticillioides Infection. *Plants* **2020**, *9*, 1112. [[CrossRef](#)]
107. Kelley, R.Y.; Williams, W.P.; Mylroie, J.E.; Boykin, D.L.; Harper, J.W.; Windham, G.L.; Ankala, A.; Shan, X. Identification of Maize Genes Associated with Host Plant Resistance or Susceptibility to Aspergillus Flavus Infection and Aflatoxin Accumulation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36892. [[CrossRef](#)]
108. Rampersad, S.N. Pathogenomics and Management of Fusarium Diseases in Plants. *Pathogens* **2020**, *9*, 340. [[CrossRef](#)]
109. Montibus, M.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C.; Pons, N. Coupling of Transcriptional Response to Oxidative Stress and Secondary Metabolism Regulation in Filamentous Fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *41*, 295–308. [[CrossRef](#)]
110. Gil-Serna, J.; Vázquez, C.; Patiño, B. Genetic Regulation of Aflatoxin, Ochratoxin A, Trichothecene, and Fumonisin Biosynthesis: A Review. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **2020**, *23*, 89–96. [[CrossRef](#)]
111. Szarka, A.; Tomasskovic, B.; Bánhegyi, G. The Ascorbate-Glutathione- α -Tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 4458–4483. [[CrossRef](#)]
112. Krieger-Liszkay, A.; Trebst, A. Tocopherol Is the Scavenger of Singlet Oxygen Produced by the Triplet States of Chlorophyll in the PSII Reaction Centre. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1677–1684. [[CrossRef](#)]
113. Bari, R.; Jones, J.D.G. Role of Plant Hormones in Plant Defence Responses. *Plant Mol. Biol.* **2009**, *69*, 473–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Berens, M.L.; Berry, H.M.; Mine, A.; Argueso, C.T.; Tsuda, K. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2017**, *55*, 401–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Wang, L.; Li, Q.; Liu, Z.; Surendra, A.; Pan, Y.; Li, Y.; Zaharia, L.I.; Ouellet, T.; Fobert, P.R. Integrated Transcriptome and Hormone Profiling Highlight the Role of Multiple Phytohormone Pathways in Wheat Resistance against Fusarium Head Blight. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Makandar, R.; Nalam, V.J.; Lee, H.; Trick, H.N.; Dong, Y.; Shah, J. Salicylic Acid Regulates Basal Resistance to Fusarium Head Blight in Wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2012**, *25*, 431–439. [[CrossRef](#)]
117. Li, G.; Yen, Y. Jasmonate and Ethylene Signaling Pathway May Mediate Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. *Crop Sci.* **2008**, *48*, 1888–1896. [[CrossRef](#)]
118. Gunnaiah, R.; Kushalappa, A.C.; Duggavathi, R.; Fox, S.; Somers, D.J. Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against Fusarium Graminearum. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40695. [[CrossRef](#)]
119. Wang, Y.; Zhou, Z.; Gao, J.; Wu, Y.; Xia, Z.; Zhang, H.; Wu, J. The Mechanisms of Maize Resistance to Fusarium Verticillioides by Comprehensive Analysis of RNA-Seq Data. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1654. [[CrossRef](#)]
120. Luo, M.; Brown, R.L.; Chen, Z.-Y.; Menkir, A.; Yu, J.; Bhatnagar, D. Transcriptional Profiles Uncover Aspergillus Flavus-Induced Resistance in Maize Kernels. *Toxins* **2011**, *3*, 766–786. [[CrossRef](#)]

121. Wang, Y.; Mostafa, S.; Zeng, W.; Jin, B. Function and Mechanism of Jasmonic Acid in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8568. [[CrossRef](#)]
122. Yi, S.Y.; Shirasu, K.; Moon, J.S.; Lee, S.-G.; Kwon, S.-Y. The Activated SA and JA Signaling Pathways Have an Influence on Flg22-Triggered Oxidative Burst and Callose Deposition. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88951. [[CrossRef](#)]
123. Kumaraswamy, K.G.; Kushalappa, A.C.; Choo, T.M.; Dion, Y.; Rioux, S. Mass Spectrometry Based Metabolomics to Identify Potential Biomarkers for Resistance in Barley against Fusarium Head Blight (*Fusarium graminearum*). *J. Chem. Ecol.* **2011**, *37*, 846–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Smirnoff, N. Tocochromanols: Rancid Lipids, Seed Longevity, and Beyond. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17857–17858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Reddanna, P.; Krishna Rao, M.; Channa Reddy, C. Inhibition of 5-Lipoxygenase by Vitamin E. *FEBS Lett.* **1985**, *193*, 39–43. [[CrossRef](#)]
126. Khanna, S.; Roy, S.; Ryu, H.; Bahadduri, P.; Swaan, P.W.; Ratan, R.R.; Sen, C.K. Molecular Basis of Vitamin E Action. Tocotrienol Modulates 12- Lipoxygenase, a Key Mediator of Glutamate-Induced Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **2007**, *23*, 43508–43515.
127. Gao, X.; Brodhagen, M.; Isakeit, T.; Brown, S.H.; Göbel, C.; Betran, J.; Feussner, I.; Keller, N.P.; Kolomiets, M.V. Inactivation of the Lipoxygenase ZmLOX3 Increases Susceptibility of Maize to *Aspergillus* Spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2009**, *22*, 222–231. [[CrossRef](#)]
128. Nalam, V.J.; Alam, S.; Keereetaweep, J.; Venables, B.; Burdan, D.; Lee, H.; Trick, H.N.; Sarowar, S.; Makandar, R.; Shah, J. Facilitation of Fusarium Graminearum Infection by 9-Lipoxygenases in Arabidopsis and Wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2015**, *28*, 1142–1152. [[CrossRef](#)]
129. Brodhagen, M.; Tsitsigiannis, D.I.; Hornung, E.; Goebel, C.; Feussner, I.; Keller, N.P. Reciprocal Oxylin-Mediated Cross-Talk in the Aspergillus-Seed Pathosystem. *Mol. Microbiol.* **2008**, *67*, 378–391. [[CrossRef](#)]
130. Scarpari, M.; Punelli, M.; Scala, V.; Zaccaria, M.; Nobili, C.; Ludovici, M.; Camera, E.; Fabbri, A.A.; Reverberi, M.; Fanelli, C. Lipids in Aspergillus Flavus-Maize Interaction. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 74. [[CrossRef](#)]
131. Qiu, M.; Wang, Y.; Sun, L.; Deng, Q.; Zhao, J. Fatty Acids and Oxylin as Antifungal and Anti-Mycotoxin Agents in Food: A Review. *Toxins* **2021**, *13*, 852. [[CrossRef](#)]
132. Burow, G.B.; Nesbitt, T.C.; Dunlap, J.; Keller, N.P. Seed Lipoxygenase Products Modulate Aspergillus Mycotoxin Biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1997**, *10*, 380–387. [[CrossRef](#)]
133. Nobili, C.; D'Angeli, S.; Altamura, M.M.; Scala, V.; Fabbri, A.A.; Reverberi, M.; Fanelli, C. ROS and 9-Oxylin Are Correlated with Deoxynivalenol Accumulation in the Germinating Caryopses of *Triticum aestivum* after *Fusarium graminearum* Infection. *Eur. J. Plant Pathol.* **2014**, *139*, 429–444. [[CrossRef](#)]
134. Battilani, P.; Lanubile, A.; Scala, V.; Reverberi, M.; Gregori, R.; Falavigna, C.; Dall'asta, C.; Park, Y.-S.; Bennett, J.; Borrego, E.J.; et al. Oxylin from Both Pathogen and Host Antagonize Jasmonic Acid-Mediated Defence via the 9-Lipoxygenase Pathway in *Fusarium Verticillioides* Infection of Maize. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19*, 2162–2176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Andrade, J.C.; Morais-Braga, M.F.B.; Guedes, G.M.M.; Tintino, S.R.; Freitas, M.A.; Menezes, I.R.A.; Coutinho, H.D.M. Enhancement of the Antibiotic Activity of Aminoglycosides by Alpha-Tocopherol and Other Cholesterol Derivates. *Biomed. Pharmacother.* **2014**, *68*, 1065–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Ghimire, B.K.; Seong, E.S.; Yu, C.Y.; Kim, S.-H.; Chung, I.-M. Evaluation of Phenolic Compounds and Antimicrobial Activities in Transgenic Codonopsis Lanceolata Plants via Overexpression of the γ -Tocopherol Methyltransferase (γ -Tmt) Gene. *South Afr. J. Bot.* **2017**, *109*, 25–33. [[CrossRef](#)]
137. Hajji, A.; Bnejdi, F.; Saadoun, M.; Ben Salem, I.; Nehdi, I.; Sbihi, H.; Alharthi, F.A.; El Bok, S.; Boughalleb-M'Hamdi, N. High Reserve in δ -Tocopherol of Peganum Harmala Seeds Oil and Antifungal Activity of Oil against Ten Plant Pathogenic Fungi. *Molecules* **2020**, *25*, 4569. [[CrossRef](#)]
138. Koval, D.; Plocková, M.; Kyselka, J.; Skřivan, P.; Sluková, M.; Horáčková, Š. Buckwheat Secondary Metabolites: Potential Antifungal Agents. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 11631–11643. [[CrossRef](#)]
139. Norton, R.A. Inhibition of Aflatoxin B(1) Biosynthesis in Aspergillus Flavus by Anthocyanidins and Related Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1230–1235. [[CrossRef](#)]
140. Norton, R.A. Effect of Carotenoids on Aflatoxin B(1) Synthesis by Aspergillus Flavus. *Phytopathology* **1997**, *87*, 814–821. [[CrossRef](#)]

5. Projet de thèse

Les données précédemment discutées ont illustré l'importance du levier variétal dans les stratégies de prévention de la contamination des maïs en mycotoxines. Elles ont aussi mis en évidence la nécessité d'approfondir la connaissance sur les mécanismes de résistance des maïs à *F. graminearum* producteur de DON et en particulier sur la composante biochimique de cette résistance. Cette connaissance est requise pour contribuer à l'amélioration des programmes de sélection variétale.

Aussi, avec comme objectif principal la compréhension des mécanismes de résistance à *F. graminearum* chez le maïs et comme objectif appliqué l'identification de marqueurs biochimiques exploitables pour la sélection de génotypes peu sensibles à l'agent pathogène et à sa production de trichothécènes, ce projet de thèse a été construit autour de trois axes de travail répondant à trois questions majeures. Chaque axe correspond à un chapitre du manuscrit.

1) Comment la composition biochimique des soies de maïs peut-elle contribuer à la résistance à l'infection ? Cet axe est centré sur la caractérisation biochimique des soies de maïs. Basé sur un panel de 20 génotypes identifiés comme sensibles ou tolérants à *F. graminearum*, il met en œuvre une approche comparative associant méthode ciblée (phenylpropanoïdes libres et liés) et non ciblée métabolomique LC-HRMS).

2) Quel rôle jouent les antioxydants lipophiles (tocochromanols et caroténoïdes) présents dans les grains matures de maïs dans la résistance à *F. graminearum* et à l'accumulation de deoxynivalenol? La caractérisation de la composition de grains de maïs matures en antioxydants lipophiles est réalisée à l'aide d'un panel de 33 génotypes de maïs identifiés comme sensibles, moyennement sensibles et tolérants à *F. graminearum*. Les relations entre compositions et niveaux de sensibilités sont investiguées.

3) Comment les antioxydants lipophiles des grains de maïs agissent sur la croissance et la toxogénèse de *F. graminearum* ? L'effet des antioxydants lipophiles est testé sur la croissance et la production de TCTB par *F. graminearum* en cultures liquides. Les mécanismes à l'origine des modulations observées sont recherchés.

Le manuscrit se terminera par une discussion générale reprenant et intégrant les principaux résultats obtenus. Une analyse critique de ces principaux résultats sera menée et les perspectives à court et long terme ouvertes par ce travail, aussi bien en termes de recherche fondamentale qu'appliquée seront présentées.

Nous verrons aussi les connaissances apportées par cette étude et comment ces études pourront être poursuivies pour valider nos résultats, et comment entrer ces études dans un objectif d'amélioration des méthodes de sélection variétales.

Chapitre 1 :

Les soies de maïs, premier rempart contre l'infection par *Fusarium graminearum* : quelles relations entre composition biochimique des soies et seuil de résistance du maïs (*Zea mays*)?

Chapitre 1 : Les soies de maïs, premier rempart contre l'infection par *Fusarium graminearum* : quelles relations entre composition biochimique des soies et seuil de résistance du maïs (*Zea mays*)?

Les soies de l'épi de maïs (*Zea mays*) représentent la première porte d'entrée pour le champignon *Fusarium graminearum* et participent à la résistance de type I (Miller *et al.* 2007). Du fait de l'impact de certains composés sur la croissance de *F. graminearum* tels que les phytohormones, les phénylpropanoïdes ou les terpènes (cf. paragraphe 4 de l'introduction générale) mais aussi de leur rôle dans la constitution des parois cellulaires et/ou leur renforcement, la composition biochimique des soies peut limiter l'infection et/ou freiner la propagation du champignon. Plusieurs études ont déjà été menées sur la composition biochimique des soies, majoritairement par des approches ciblées, et ont mis en évidence la présence de composés comme des acides phénoliques, des flavones ou encore des anthocyanes (El-Ghorab *et al.* 2007; Kuhnen *et al.* 2010; Wang *et al.* 2019). Cependant l'étude des soies est limitée par la fragilité de celles-ci, en effet les soies ne restent intègres sur l'épi que quelques jours et s'oxydent très rapidement une fois récoltées (Bassetti & Westgate 1993), ce qui conduit à la dégradation de nombreux composés.

Ce chapitre a pour objectif de mettre en œuvre une stratégie analytique combinant approche ciblée (LC/DAD) et non ciblée (LC/MS) pour caractériser exhaustivement la composition biochimique des soies de maïs appartenant à différents génotypes et dans un second temps, d'analyser les relations entre composition biochimique et niveau de résistance à *F. graminearum*.

Après une première étape d'optimisation méthodologique, nous nous intéresserons à : (1) la composition des soies en acides phénoliques liés et leur relation avec la sensibilité/résistance à *F. graminearum*, (2) la composition globale en composés polaires solubles des soies par une approche métabolomique, (3) l'identification de marqueurs biochimiques de sensibilité/résistance à *F. graminearum*.

Chap1. I) Choix et optimisation des méthodes pour la caractérisation biochimique des soies de maïs.

Pour l'analyse des composés phénoliques liés, nous avons utilisé une méthode d'extraction par de l'acétate d'éthyle avec une saponification préalable suivie d'une analyse par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrophotométrie UV-VIS (LC/DAD). Pour les composés polaires solubles l'extraction s'est faite par une méthode hydrométhanolique et l'analyse par une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).

Une optimisation de méthode a été nécessaire pour conserver au maximum l'intégrité des soies durant le traitement et pour optimiser la détection des composés par HPLC/DAD et HPLC/MS/MS.

Pour cela, des tests préliminaires ont été réalisés sur un panel réduit d'échantillons incluant 2 lignées parentales. Tous les échantillons tests ont été cultivés à Garlin dans le Sud-Ouest de la France lors de l'année 2019 dans des conditions non-inoculées artificiellement. Les échantillons de soies ont été récoltés à 4 et 6 jours après la floraison. La méthode de récolte consistait dans le prélèvement de la totalité de l'épi et d'une partie de la tige comprenant les nœuds supérieurs et inférieurs de l'épi, puis un stockage des échantillons pendant environ 3 h dans une boîte contenant des blocs de glace pour limiter l'oxydation pendant le transport. Les soies ont ensuite été séparées en deux échantillons à partir du même épi et plongées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C. Les récoltes à 6 jours après floraison ont montré visuellement une importante oxydation des soies, par conséquent seules les récoltes à 4 jours après floraison ont été sélectionnées pour les années 2020 et 2021. Les échantillons ont ensuite été lyophilisés avant extraction ; cependant nous avons observé que la lyophilisation entraînait une perte partielle de plusieurs acides phénoliques liés, notamment les acides protocatéchique, chlorogénique et benzoïque. Par conséquent la décision a été prise d'extraire les composés polaires solubles directement des soies fraîches congelées et les acides phénoliques liés des soies séchées suite à l'extraction des composés solubles.

Pour les acides phénoliques liés, la méthode utilisée a été adaptée de celle utilisée habituellement au laboratoire pour l'extraction des acides phénoliques des grains de maïs. Les extraits ont été dilués au 1/50 dans un mix MeOH/eau (50/50, v/v) pour la quantification de l'acide férulique. Pour l'analyse en LC/DAD, plusieurs gradients d'élution ont été testés. Les gradients testés sont résumés dans le Tableau 1. La première méthode induisait une trop faible différence des temps de rétention des composés, empêchant l'analyse. La seconde méthode permettait une bonne séparation des composés, mais avec des chromatogrammes de plus de 50 minutes. La troisième méthode permettait une bonne séparation des pics avec un temps plus court que la méthode 2. Ces différents essais nous ont conduit à définir et utiliser le gradient « méthode finale » pour l'ensemble des analyses.

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par étalonnage externe avec des solutions de standards. Les longueurs d'ondes pour la quantification ont été choisies selon le maximum d'absorption de chaque molécule ; 320 nm pour les acides chlorogénique, caféique, vanillique et férulique et 260 nm pour les acides protocatéchique et benzoïque. Dans notre méthode, les acides caféique et vanillique ont le même temps de rétention ; il n'est pas possible de les différencier et la quantification de la somme des composés sera exprimée en équivalent acide caféique.

Tableau 1. Gradients d'élution utilisés pour l'optimisation de la séparation des acides phénoliques.

Première méthode		
Temps (min)	Eluent A (%)	Eluant B (%)
0	95	5
10	80	20
12	5	95
17	5	95
19	95	5
26	95	5

Deuxième méthode		
Temps (min)	Eluent A (%)	Eluant B (%)
0	95	5
30	85	15
50	50	50
58	10	90
63	10	90
65	95	5

Troisième méthode		
Temps (min)	Eluent A (%)	Eluant B (%)
0	95	5
10	80	20
20	50	50
30	5	95
35	5	95
36	95	5
42	95	5

Méthode finale		
Temps (min)	Eluent A (%)	Eluant B (%)
0	95	5
10	80	20
20	50	50
22	5	95
26	5	95
29	95	5
35	95	5

Ces méthodes d'extractions et d'analyses optimisées ont été appliquées aux échantillons test 2019 et ont permis une bonne discrimination entre nos deux lignées parentales.

La méthode utilisée pour l'extraction des composés polaires solubles a été adaptée de celle décrite dans la thèse de Léa Gauthier (2015) utilisée pour l'extraction du métabolome des grains de maïs. Huit g de soies fraîches congelées ont été broyées dans un pot droit de 125 mL avec un broyeur à colonne Ultra Turrax dans 20 mL de méthanol/eau (70/30, v/v) contenant 0.2% d'acide acétique pendant 1 minute. Le volume a été sélectionné pour être suffisant pour recouvrir les 8 g de soies et ne pas déborder du conteneur pendant le broyage. Les échantillons ont ensuite été passés au sonicateur pendant 5 min, centrifugés 2 minutes (3000 g, 4 °C). Deux mL du surnageant ont été filtrés à l'aide de filtres 0.2 µm dans des vials pour analyses LC/MS. Les culots ont été ensuite séchés sous hotte à l'air libre. Dans les étapes d'optimisation de méthodes, nous avons constaté que pour l'extraction de composés solubles la sortie des échantillons stockés à -80°C et leur conservation dans la glace avant broyage ne limitait que peu l'oxydation, par conséquent la décision a été prise de ne traiter que quelques échantillons en même temps. La sélection de la méthode pour l'analyse LC/MS en mode d'ionisation positif ou négatif a été faite en fonction du nombre de signaux détectés (9911 pour le mode positif et 6279 pour le mode négatif) et du nombre de signaux discriminants entre les sensibles et les résistants (117 pour le mode positif et <10 pour le mode négatif) sur un jeu test de 6 échantillons récoltés en 2019. Le mode positif a donc été sélectionné.

Chap 1. II) The biochemical composition of maize silks contributes to the host susceptibility to *Fusarium graminearum*

Jean-Marie Savignac, Vessela Atanasova, Sylvain Chereau, Stéphane Bernillon, Nathalie Gallegos, Florence Richard-Forget

A- Introduction

Maize silks are the elongated styles of the maize (*Zea mays*) female inflorescence. They are the organs growing on the top of the cob linked to the kernel and emerging from the husks to permit the pollination. Pollen is deposited from the panicle on the silk. There the pollen germinates and gives rise to a pollen tube that follows the silk road to the cob to fecundate the ovule and form the maize kernel. Silks begin their elongation from the ovules of the cob, then elongate quickly by expansion of existing cells. Silk elongation occurs for up to 10 days. Maize silks are known to contain a wide range of bioactive compounds including volatile oils, steroids and antioxidant metabolites such as phenylpropanoids (Rajeshwari & Sivapriya 2021; Singh *et al.* 2022) and are frequently used in several traditional medicines. The most widely studied class of maize silk bioactive compounds is certainly phenylpropanoids and more precisely phenolic acids, the concentration of which being dependent on the genetic origin and variety (Hu *et al.* 2010; Azevedo *et al.* 2022). The environmental conditions are also key parameters influencing the richness in phenolic compounds (Schöneberg *et al.* 2018). The concentration of phenolic acids may also vary depending on the age of the silks, as the phenomena of oxidation will negatively affect the composition of phenolic compounds. Among phenolic acids, ferulic acid, *para*-coumaric acid, caffeic acid, and other hydroxycinnamic acids have been determined (Žilić *et al.* 2016). In addition to phenolic acids, maysin, a C-glycosyl flavone reported to confer resistance to the maize earworm (Casas *et al.* 2016) and to exhibit interesting medicinal properties (Hasanudin *et al.* 2012) has received particular attention.

Due to the protection of the ear by the husks, maize silks represent the first and major entry of the pathogen *Fusarium graminearum*. This pathogen is the causal agent of Gibberella ear rot (GER), a devastating fungal disease affecting maize worldwide. *F. graminearum* is also the main responsible of the contamination of the maize kernels with the deoxynivalenol mycotoxin, a harmful metabolite to human and livestock health. *F. graminearum* is able to infect the maize ear through both wounds and the silk canal (Thompson & Raizada 2018). Incremona *et al.* (Incremona *et al.* 2014) have indicated that *F. graminearum* caused more damage when infection occurred through wounds than through silks, suggesting the existence of specific resistance mechanisms associated with silks. The spores of the fungi will be deposited on silks by splashing or by insects and then germinate along the silk until reaching the kernels. Several characteristics of the silks have been reported to increase or reduce the

ability of the fungus to contaminate the maize ears. They include the quantity of tissues (Reid *et al.* 1992b), the age of the silks (Munkvold 2003) or their biochemical composition (Reid *et al.* 1992a; Bily *et al.* 2003). Most of the studies addressing the contribution of silk biochemical composition to resistance to *F. graminearum* have focused on phenylpropanoids. A significant percentage of silk phenolic compounds are bound to the cell wall and participate to the mechanical resistance and therefore are potentially involved in general defense system against pathogens (Adom & Liu 2002; Ye *et al.* 2013). In addition, phenolic compounds also occur as soluble forms in vacuoles of plant cells (Das & Singh 2015). Phenolic acids have been widely studied for their antioxidant activity; these properties being partly responsible for the benefits they could have on human health and their importance in several defense mechanisms in plants. In addition, phenolic acids have also been reported to act directly against several fungi: the antifungal activity of protocatechuic acid against *Colletotrichum circinans*, of chlorogenic and vanillic acids against *Phytophthora infestans*, or *para*-coumaric acid against *Gloeosporium perennas* has been described (Lattanzio *et al.* 2006). Considering *F. graminearum*, ferulic acid but also other hydroxycinnamic acids such as caffeic and chlorogenic acids, have been characterized for their fungicidal properties (Atanasova-Penichon *et al.* 2016). The previous phenolic acids were also described as inhibitors of the production of mycotoxins (Bily *et al.* 2003; Boutigny *et al.* 2009; Ponts *et al.* 2011; Gautier *et al.* 2020), this inhibition being associated with a negative transcriptional control of key biosynthetic genes such as the *tri* genes for deoxynivalenol (Boutigny *et al.* 2009). For a comprehensive view of the effects of phenolic compounds on toxigenic *Fusarium* species, we strongly encourage the reader to have a look on the publication of Chtioui *et al.* (Chtioui *et al.* 2022). However, the available knowledge on the role of metabolites in silk resistance to *F. graminearum* has been hitherto mainly delivered by studies based on analytical targeted approaches applied to a reduce set of genotypes. As reviewed by Richard-Forget *et al.* (Richard-Forget *et al.* 2021), untargeted metabolomics technologies hold great promise to deepen the knowledge on the key biochemical factors occurring in plant tissues that contribute to plant defense against toxigenic fungi. In the present study, an analytical strategy combining targeted and untargeted approaches has been applied to a set of 20 genotypes of maize to provide a comprehensive view of the silk maize composition but also investigate the occurrence of yet understudied metabolites that could contribute to resistance to *F. graminearum*.

B- Material and method

B.1- Plant material and field management

Plant material consisted in 20 inbred lines of maize provided by Syngenta® Seeds Company. The 20 inbred lines were grown in 2020 and 2021 in a field trial located at Garlin, in the southwest of France (43°32' N, 0°22' O). Inbred lines were cultivated in two blocks, each block containing 20 plants of the 20 inbred lines. All plants were open-pollinated. Three maize ears per block and per inbred line were collected at 4 days post-flowering, separated in two silk samples, weighted, flash frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C until extraction. One sample from each harvested batch of silks was used for extraction and the second conserved in case of improper handling leading to oxidation.

Syngenta® provided the GER susceptibility notations of the inbred lines. Susceptibility notations were made using a Bolton-like scale (1-9 notations) on several years and several environments. Notations were carried out with both natural infection and artificial inoculation. The arithmetic mean was calculated for determining the final level of susceptibility. S1 notation represents tolerant lines (noted 1-2) and S3 notation represents susceptible lines (noted >4). The panel used within this study contained 10 S1 genotypes and 10 S3 genotypes (Table 1).

Table 1. Notations and susceptibility of the 20 genotypes. The notation results from visual phenotyping made by Syngenta, over 9 years.

Genotypes	Average notation	Susceptibility	Average natural infection notation	Natural infection susceptibility	Average artificial inoculation notation	Artificial inoculation susceptibility
G1	1.3	S1	1.1	S1	1.4	S1
G2	1.2	S1	1.0	S1	1.3	S1
G3	1.5	S1	1.0	S1	1.6	S1
G4	1.5	S1	1.5	S1	1.5	S1
G5	1.3	S1	1.3	S1	1.3	S1
G6	6.7	S3	5.7	S3	7.6	S3
G7	5.6	S3	3.0	S2	6.4	S3
G8	7.2	S3	5.8	S3	7.8	S3
G9	6.4	S3	1.8	S1	8.3	S3
G10	6.0	S3	1.0	S1	8.0	S3
G11	5.8	S3	6.3	S3	5.2	S3
G12	1.3	S1	1.5	S1	1.2	S1
G13	1.8	S1	1.1	S1	2.2	S2
G14	6.4	S3	7.3	S3	5.8	S3
G15	1.5	S1	1.5	S1	1.5	S1
G16	5.0	S3	5.3	S3	4.9	S3
G17	4.5	S3	2.5	S2	5.5	S3
G18	1.4	S1	1.0	S1	1.5	S1
G19	1.7	S1	1.0	S1	1.8	S1
G20	5.9	S3	6.5	S3	5.8	S3

B.2- Chemicals and reagents.

Solvents (water, methanol (MeOH) and acetonitrile LC grade) were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Reagents (butylated hydroxytoluene (BHT), acetic acid, sodium hydroxide (NaOH), formic acid and hydrochloric acid (HCl),) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain), Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), MP Biomedicals (Illkirch, France), Merck (Bordeaux, France) and Thermo Fischer Scientific (Illkirch, France).

B.3- Extraction of polar soluble metabolites for metabolomics analyses

Approximately 6 g of frozen (-80°C) fresh corn silks were soaked with 20 mL of methanol / water mix (70/30, v/v) with 0.2% acetic acid and grinded with an IKA Ultra Turrax® T 25 digital (IKA-Werke GmbH Co. KG, Germany) at 16000 rpm for 1 min. The solution was then sonicated 5 minutes and centrifugated 10 minutes at 3000 *g* and 4°C. Two mL of the solution was filtered on 0.2µm filters (acrodisc 13mm minispikes PTFE, Pall Corporation) and transferred into vials for LC/MS/MS analysis. 200µL of each sample were pooled to make a quality control (QC) sample for analysis and the samples were stored at -20°C until analysis. The remains pellets were dried under hood overnight for the further extraction of bound phenolics.

Metabolomics LC/MS analyses were performed using a Vanquish UHPLC system coupled to an Orbitrap QExactive Focus mass spectrometer (ThermoScientific, Bremen, Germany). Chromatographic separation was performed on a Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ (100 mm × 2.1 mm, 1.9 µm) column (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland). The column temperature was maintained at 35 °C. A mobile phase consisting of 0.1% acetic acid in water (A) and 0.1% acetic acid in acetonitrile (B) was used to elute the compounds according to the optimized gradient program, as follows: 5% B from 0 to 1.4 min; 5%-25% B from 1.4 to 4.5 min; 25%-70% B from 4.5 to 11 min; 70%-95% B from 11 to 14 min; 95% B from 14 to 17.5 min; 95%-5% B from 17.5 to 18 min; 95% B from 18 to 23 min. The flow rate was set at 0.4 mL.min⁻¹. An injection volume of 5 µL was used for both the reference compounds and the analytical samples. The detection UV wavelengths were set at 260 nm and 320 nm.

For MS positive mode detection, the operating parameters were: spray voltage, +3500 V; nebulizing gas, nitrogen; sheath gas temperature, 350 °C; sheath gas flow rate, 35 arb; aux gas flow rate, 10 arb; capillary temperature, 320 °C; S-lens RF, 60%; resolution, MS full scan resolution power 70,000 FWHM, MS/MS full scan resolution power 17,500 FWHM; scan range, m/z 80–1100 for MS; m/z 30–1500 for MS/MS; scanning mode, fullscan with data-dependent MS/MS acquisition. MS/MS spectra were acquired after ion fragmentation in the HCD cell with a NCE of 30 % using nitrogen as the collision gas. Acquired data were processed with Compound Discoverer® 3.2 (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland) v 3.2.0.421. A matrix including retention time, m/z and peak intensity information was obtained after peak matching, peak alignment and peak extraction. The MS and MS/MS data of

interesting ions were then matched with the Chemspider, m/z Cloud and Metabolika pathway databases with mass tolerance of 5 ppm. Chemical formulae were predicted by Compound Discoverer® with prediction mass tolerance of 3 ppm and fragment mass tolerance of 5 ppm. Quality control correction was applied using QC samples and background compounds were removed.

B.4- Phenolic acid extractions and analysis

100 mg of remaining pellets after hydromethanolic extraction were weighted in a corning 15 mL (Fischer Scientific, Illkirch, France). 4 mL of NaOH 2N were added and agitated on a wheel at 50 rpm for 2 hours. 700 µL of HCl 10N were then added followed by successive addition of 20 µL HCl 1N to acidify the solution at pH 2-3. The extraction was made twice with ethyl acetate layers (2 x 5 mL) after agitation on a wheel at 50 rpm and centrifugation at 3000 g at room temperature. 8 mL of the organic layer was then evaporated to dryness under nitrogen stream. Dried samples were reconstituted in 500 µL of MeOH/water (50/50; v/v), filtered using 0.2 µm filters (acrodisc 13mm minispikes PTFE, Pall Corporation) and transferred into amber LC vials for analysis.

Phenolic acids were quantified by LC/DAD using an Agilent Technologies 1100 series system equipped with an auto sampler system, an Agilent DAD detector and the ChemStation chromatography manager software Rev. A.10.02 (Agilent, Les Ulis, France). Separation of compounds was achieved on a Kinetex 2.6 µm XB-C18 100 Å LC column (100 mm x 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Le Pecq, France), maintained at 45°C. The mobile phase A consisted of water with 0.2% formic acid and the phase B of acetonitrile with 0.2% formic acid. Phenolic acids were separated using a gradient elution as follows: 5–20% B in 10 min, 20–50% B in 10 min, 50-95% B in 2 min, 95% B for 4 min, 95–5% B in 3 min, 5% B for 6 min. The flow rate was kept at 1 mL.min⁻¹. The injection volume was 5 µL. The UV-visible spectra were recorded from 190 to 500 nm and peak areas were measured at 260, 280, 320 and 360 nm. Quantification was performed by external calibrations with standard solutions prepared from commercial pure powders. Standards of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, benzoic acid and ferulic acid were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and dissolved in MeOH/water (50/50; v/v) from 5 to 100 mg.L⁻¹. These standards were used as calibration curves.

B.5- Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) and boxplots for bound phenolic compounds were performed using R x64 4.1.4 and RStudio software v 1.3.1093 (Boston, USA) and packages FactoMineR and ggplot2. Results of bound phenolic acids were reported as mean values of six biological replications. Normal distribution of the values was tested with Shapiro-Wilk tests. Kruskal-Wallis tests were carried out and statistics were realized with pairwise Wilcoxon test. ANOVA statistical analysis were realized using XLStat 2022.4.1 software. For all tests, the level of significance was set at $p \leq 0.05$.

C- Results

C.1 - Bound phenolic acid composition of silks harvested in 2020 and 2021

Bound phenolic acid composition of silks from the 20 maize genotypes characterized by opposite levels of GER susceptibility was analyzed using LC/DAD. Major peaks were observed at 260 and 320 nm and identified by comparison of UV spectra with standard solutions of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid, *trans*-ferulic acid, protocatechuic acid and benzoic acid. Five more peaks were also identified by comparison of absorbance spectra with the laboratory database as different forms and dimers of ferulic acid: *cis*-ferulic acid, 8-5' diferulic acid (8-5'DiFA), 5-5' diferulic acid (5-5'DiFA), 8-O-4' diferulic acid (8-O-4'DiFA) and 8-5' benzofuran diferulic acid (8-5'BenDiFA). The minimum, maximum and average values of bound phenolic acid concentrations for silks collected in 2020 and 2021 are reported in Table 2. The details of the values by genotype is available in supplementary Table 1.

Bound phenolic acid concentrations were in the range of 440.9 and 23206.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for 2020 and 909.1 and 12913.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ for 2021. ANOVA analysis shows differences in concentrations between the two years of analysis for *trans*-ferulic acid (a reduced concentration by almost 50% in 2021), *cis*-ferulic acid (up to 10 times more abundant in 2021), ferulic acid dimers (up to 6 times more abundant in 2021) and chlorogenic acid with $p\text{-value} < 0.0001$ and no differences for the other phenolic compounds.

The major bound phenolic acid found in maize silks was *trans*-ferulic acid reaching a concentration close to 23 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and 12 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2021 and representing more than 95% of the total bound phenolic acids for the two years of observation. *Para*-coumaric acid was shown as accounting for approximately 5% of the total, while the other ones were present in negligible quantity (<0.5%).

Table 2. Summary of maximum, minimum and average of bound phenolic acids found in silks in 2020 and 2021.

	Min ($\mu\text{g}/\text{g}$ pellet)		Max ($\mu\text{g}/\text{g}$ pellet)		Average ($\mu\text{g}/\text{g}$ pellet)	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Protocatechuic acid	ND*	ND	54,7	45,8	11,2	12,9
Benzoic acid	ND	1	38,1	31,9	8,9	9,7
Chlorogenic acid	ND	ND	53,4	32,7	8,0	1,5
Caffeic/Vanillic acid	1,8	2,1	39,9	58,8	14,5	15,7
<i>Para</i> -coumaric acid	18,4	47	617,7	842,2	321,1	300,3
<i>Trans</i> -Ferulic acid	2500	1033,6	22725,2	11863,8	6982,2	4309,5
<i>Cis</i> -Ferulic acid	0,3	27,1	118,7	1282,5	42,3	267,54
8-5'DiFA	ND	1,7	21,8	121,3	8,8	49
5-5'DiFA	ND	0,9	37,2	121,7	14,2	31,3
8-O-4'DiFA	0,2	1,8	51,2	497,6	19,8	81,2
8-5'BenDiFA	0,4	1,7	62,1	335,2	26,8	83,3
Total	440,9	909,1	23206,5	12913,7	7458,2	5162,4

*ND = Not Detected. Caffeic acid and vanillic acid were not separated and quantified together in caffeic acid equivalent.

C.2 - Relation between bound phenolic acids and resistance to GER

In order to evaluate whether bound phenolic acid composition discriminates tolerant and susceptible genotypes of maize; PCA were performed for the 20 genotypes and the 12 variable values of 2020 and 2021 separately (Figure 1A, B). For the 2020 PCA, the Dim1 represented 26.5% of the total variance and the Dim2 22%. For the 2021 PCA, the Dim1 represented 43.4% of the total variance and the Dim2 16.6%. (Figure 1). For both years, we observed no clear separation between S1 and S3 groups of genotypes. However, in 2021, the score plot reported in Figure 1B seems to indicate a clustering tendency between tolerant and susceptible genotypes on the Dim 2 axis. Nevertheless, the PCA analysis does not allow concluding that bound phenolic acids could be implicated in resistance/susceptibility of genotypes against *F. graminearum*.

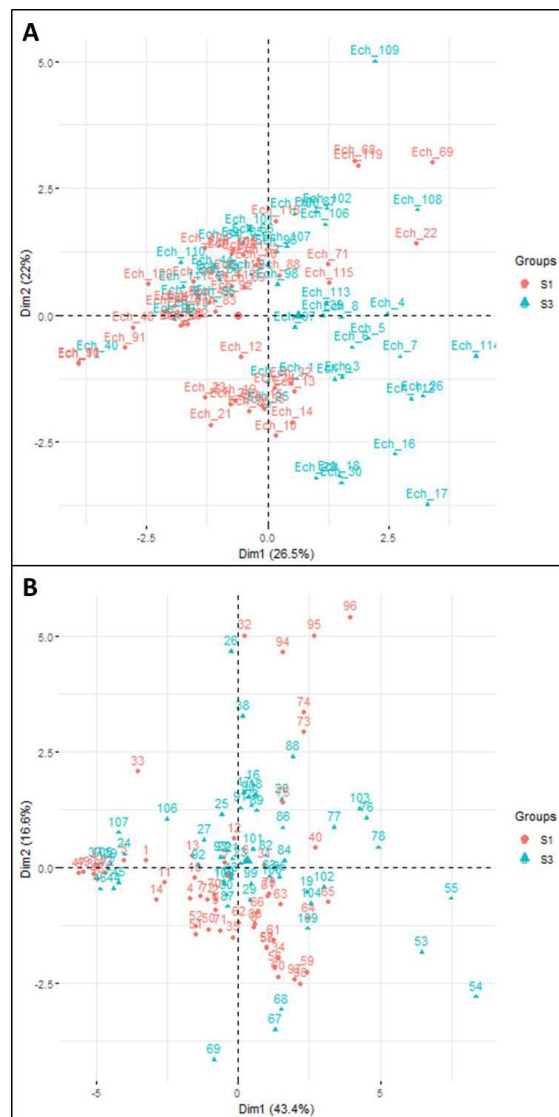


Figure 1. Scores plot for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis (110 samples, 12 variables for 2020 and 91 samples, 12 variables for 2021) of the phenolic acids found in maize silks. A: Score plot of 2020 samples. B: Score plot of 2021 samples. Red dots represent the tolerant (S1) genotype samples and blue dots represent the susceptible (S3) genotype samples.

Non-parametric univariate statistical analyses were used to assess any significant separation of tolerant and susceptible groups of genotypes. Data are gathered in Figures 2 (A-L) for 2020 and in Figures 3 (A-L) for 2021. In 2020, a statistically significant difference was observed only for *cis*-ferulic acid which was more present in S3 genotypes with a mean of $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry maize silks in comparison with S1 characterized by a mean value of $30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry maize silks ($p = 0.0061$). Regarding 2021 data, caffeic/vanillic acid ($p = 0.0026$), *cis*-ferulic acid ($p = 6.5\cdot 10^{-7}$) and different dimers of ferulic acids (5-5'DiFA, 8-O-4'DiFA and 8-5'BenDiFA with $p = 0.01$, $p = 0.00015$ and $p = 0.0009$ respectively) were significantly in higher concentrations in the susceptible genotypes S3 than in tolerant S1 genotypes. The total concentration of bound phenolic acids in 2021 samples was also significantly more important in silks from susceptible S3 genotypes than in S1 ones ($p = 0.0023$).

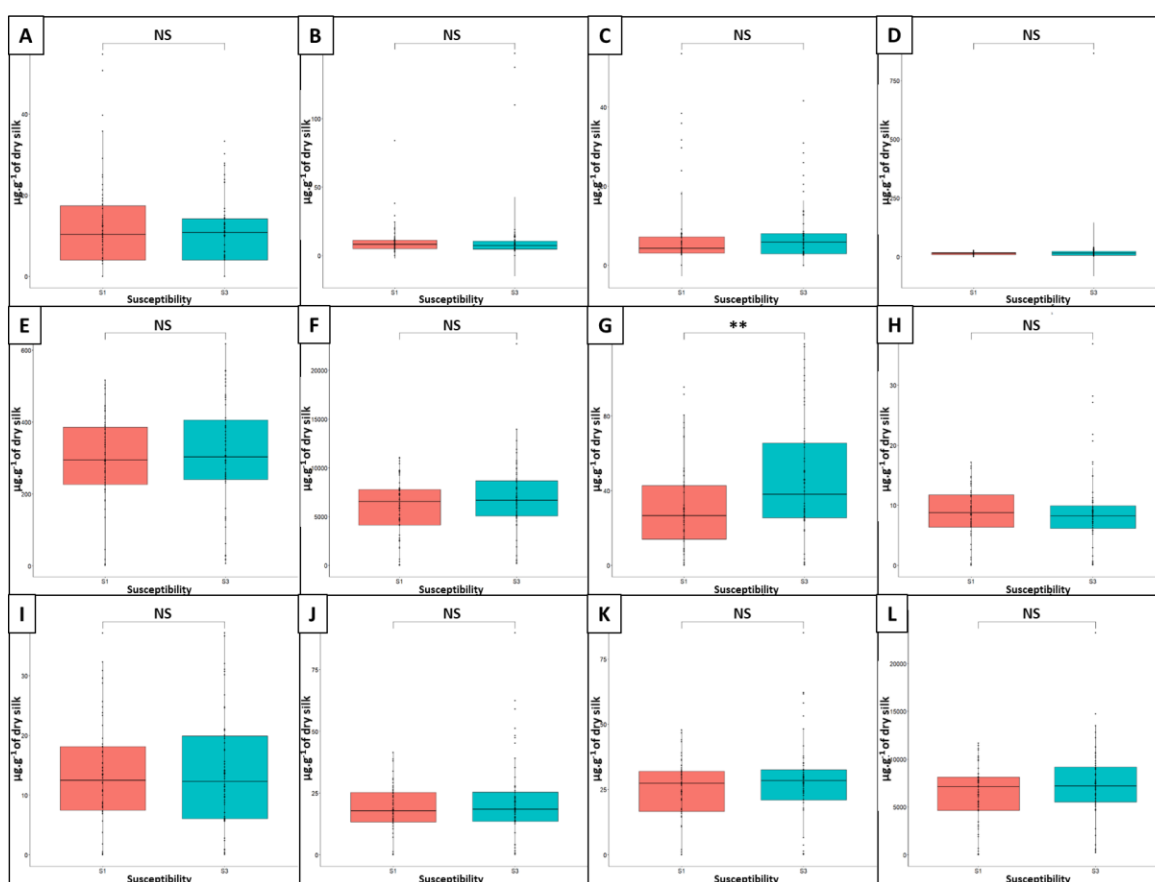


Figure 2. Boxplots of phenolic acids in susceptible and tolerant genotypes in 2020 samples ($n = 110$). A: Boxplots of protocatechuic acid. B: Boxplots of benzoic acid. C: Boxplots of chlorogenic acid. D: Boxplots of caffeic and vanillic acid. E: Boxplots of *para*-coumaric acid. F: Boxplots of *trans*-ferulic acid. G: Boxplots of *cis*-ferulic acid. H: Boxplots of 8-5'DiFA. I: Boxplots of 5-5'DiFA. J: Boxplots of 8-O-4'DiFA. K: Boxplots of 8-5'BenDiFA. L: Boxplot of total phenolic acids. Red boxplots correspond to tolerant genotypes and blue boxplots correspond to susceptible genotypes. Stars ** ($p = 0.01$) and NS (non-significant) indicate significant differences when compared with control (Wilcoxon test). Values are expressed in μg of phenolic acids per g of maize silks.

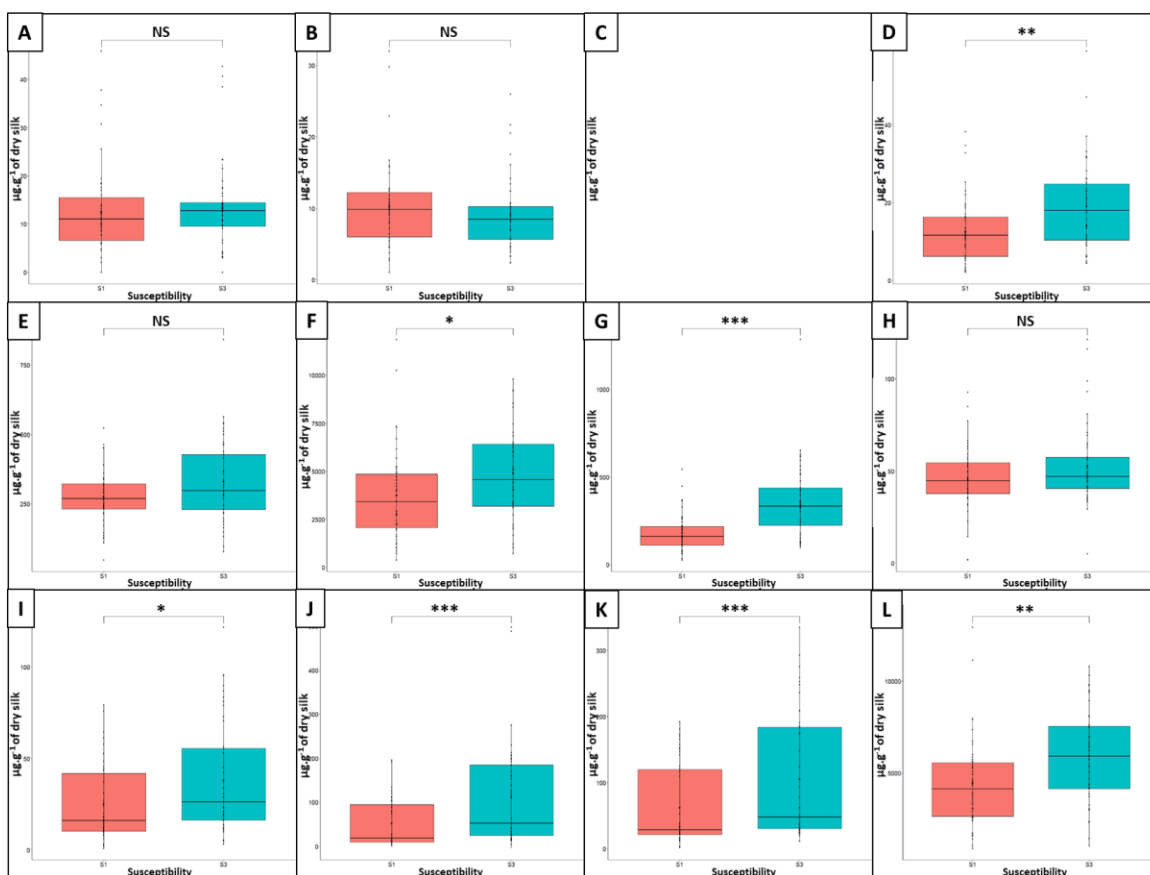


Figure 3. Boxplots of phenolic acids in susceptible and tolerant genotypes in 2021 samples (n=91). A: Boxplots of protocatechuic acid. B: Boxplots of benzoic acid. C: Boxplots of chlorogenic acid, no data. D: Boxplots of caffeic and vanillic acid. E: Boxplots of *para*-coumaric acid. F: Boxplots of *trans*-ferulic acid. G: Boxplots of *cis*-ferulic acid. H: Boxplots of 8-5'DiFA. I: Boxplots of 5-5'DiFA. J: Boxplots of 8-O-4'DiFA. K: Boxplots of 8-5'BenDiFA. L: Boxplot of total phenolic acids. Red boxplots correspond to tolerant genotypes and blue boxplots correspond to susceptible genotypes. Stars * ($p = 0.05$), ** ($p = 0.01$), *** ($p < 0.01$) and NS (non-significant) indicate significant differences when compared with control (Wilcoxon test). Values are expressed in μg of phenolic acids per g of maize silks.

C.3 - Metabolomics analysis of polar soluble compounds occurring in maize silks

C.3.a Composition in polar soluble compounds of maize silks and putative identification

Metabolomics was done on the same samples as used for bound phenolic acids analysis on the two years of cultivation. Thus, a total of 120 samples was used for metabolomics analysis. We detected after software analysis using our workflow a total of 2819 signals in 2020 and 1789 in 2021.

On PCA score plots (PC1 vs PC2) reported on Figure 4, it clearly appears that the metabolomic analysis we performed allows a good grouping of the genotype replicates. No trend according to the field repetition was evidenced suggesting a lack or negligible effect of the line location within the field for the same year of cultivation. However, it is important to underline that on the PCA for both 2020 and

2021 years, the distribution of genotypes in the plane defined by the first two components, explain less than 35% of the total variance.

More than 100 compounds were putatively identified with the software Compound Discoverer® and validated by comparison with the m/z cloud database (Supplementary Table 2). In addition, another annotation process using the GNPS online database (Supplementary Table 3) was realized, which has allowed to putatively identify 203 compounds. Using these two identification strategies, 20 molecules were similarly found in maize silks, leading to a total of 283 putatively identified molecules. The pie chart represented on Figure 5 described the different classes of compounds that have been putatively identified. We observe a large majority of phenylpropanoids-derived metabolites with almost 50 % of the total putatively identified compounds. Among these compounds, we found a majority of flavonoids (25 % of the total), quinic acid and derivatives (15 %), isoflavonoids (3 %) and cinnamic acids and derivatives (3 %). The other major class found in our extracts is linked with fatty acid pathway and gathers fatty acyls (9 %), prenol lipids (8 %), glycerolipids (2 %) and glycerophospholipids (2 %). Finally, an important part of putatively identified compounds corresponds to amino acids that account for 10 % of the total. Looking at the total of signals observed in our extractions, these analyses led to the putative annotation of almost 12 % of all compounds. We have annotated each signal with a unique ID, and levels of confidence have been set as indicated by Sumner *et al.* (Sumner *et al.* 2007) with confidence level 3 for putatively characterized compound classes and level 2 for putatively annotated compounds with spectra similarity up to 70% to public spectral libraries (m/z Cloud library and GNPS library). Chemical formulas have been determined by the observed $[M+H]^+$ accurate mass and have been selected as proposed in predicted compositions by Compound Discoverer® with higher rank based on matched isotopes and fragments.

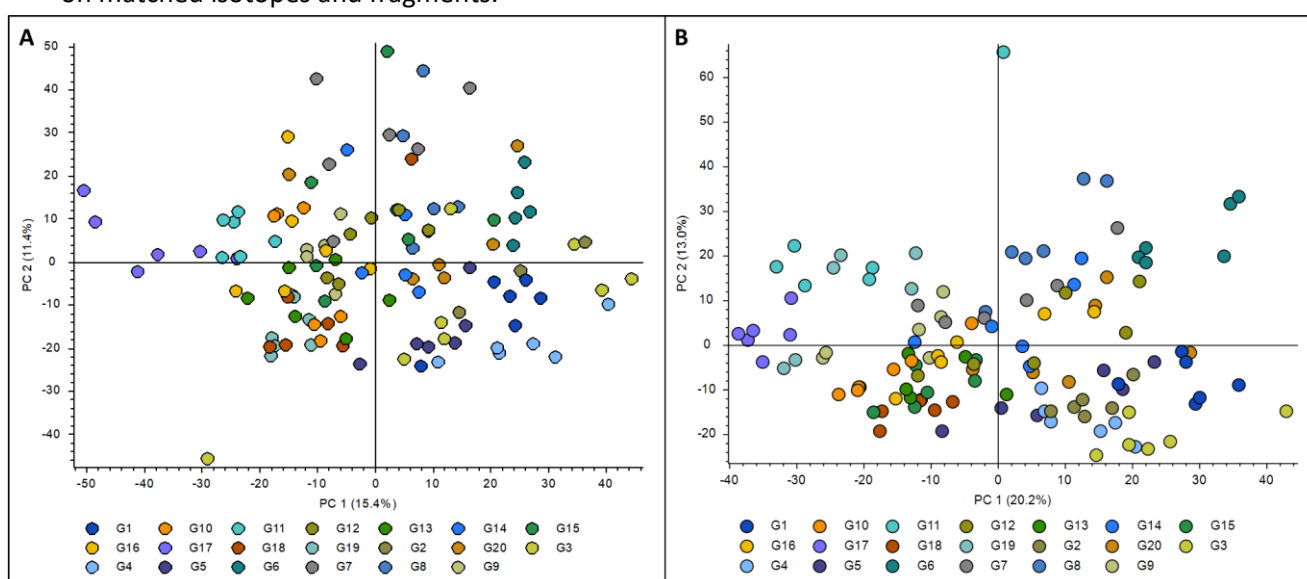


Figure 4. Scores plot for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis (120 samples, 2819 variables for 2020 and 120 samples, 1789 variables in 2021) of signals found in metabolomic studies. A: Score plot of 2020 samples. B: Score plot of 2021 samples. Each color represents a genotype (G1 to G20).

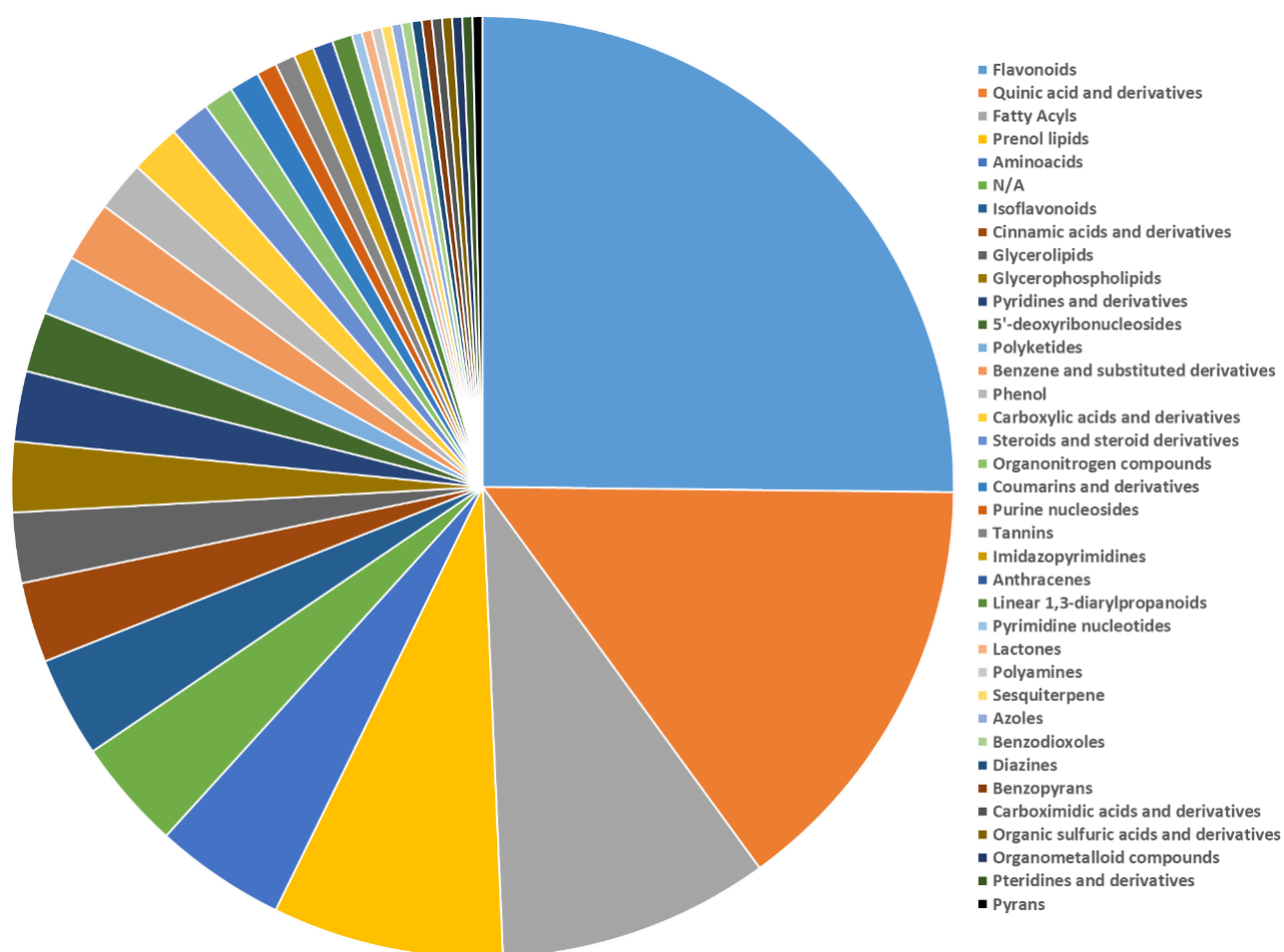


Figure 5. Pie chart of compounds putatively identified by Compound Discoverer and GNPS analyses.

C.3.b Relations between polar soluble compounds of maize silks and resistance to GER

In order to investigate potential relationships between the polar soluble composition of silks and maize susceptibility to GER, PCAs were performed for both susceptible and tolerant groups of genotypes harvested in 2020 and in 2021 (Figure 6A,6B). The PCA score plots (PC1 vs PC2) reported in Figure 6 indicate the differences between tolerant (S1) and susceptible (S3) genotypes used for the metabolomics studies. These PCA score plots were realized with all signals considered as variables (2819 for year 2020 and 1789 for year 2021). On the two years of observations a tendency of discrimination between genotypes S1 and S3 could be observed on the axis PC2 explaining 11.4 % of the total variance for 2020 and 13.0 % of the total variance for 2021. This discrimination between S1 and S3 groups of genotypes suggests that compounds present in silks could contribute to the tolerance and susceptibility of the lines.

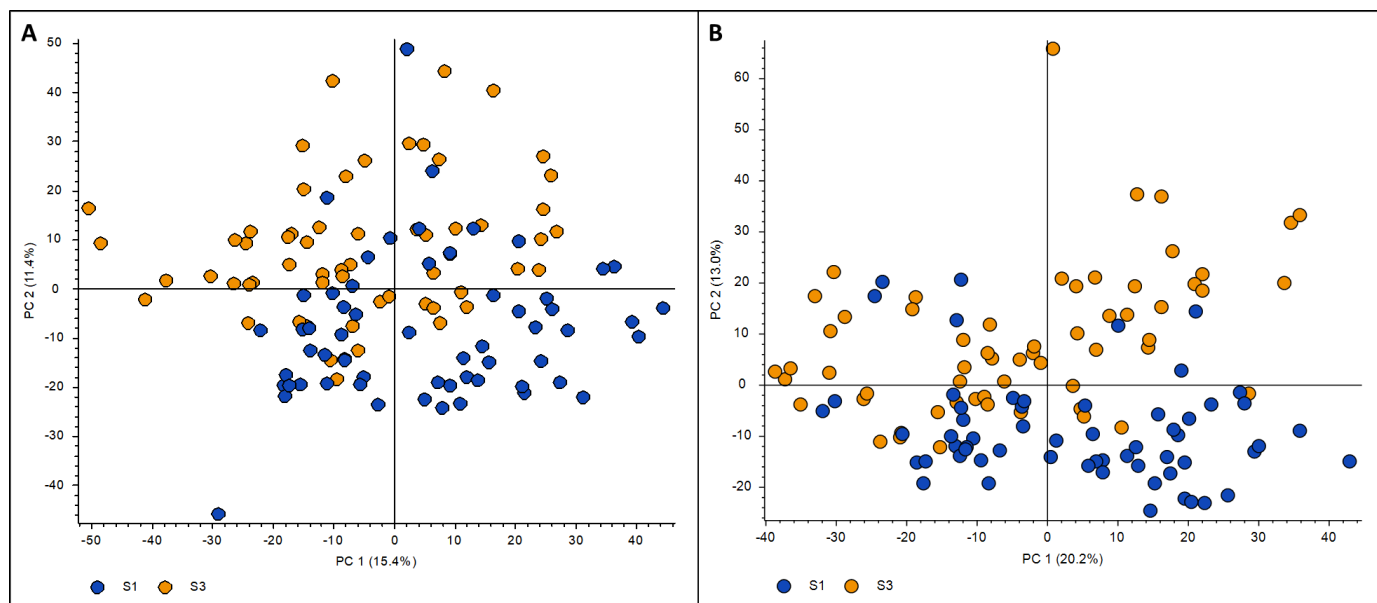


Figure 6. Scores plot for PC1 and PC2 of Principal Component Analysis (120 samples, 2819 variables for 2020 and 120 samples, 1789 variables in 2021) of signals found in metabolomic studies. A: Score plot of 2020 samples. B: Score plot of 2021 samples. Orange dots represent the tolerant (S1) genotypes samples and blue dots represent the susceptible (S3) genotypes samples.

We decided to consider compounds with an abundance fold change between S1 and S3 of 2 log₂ times minimum and a p-value ≤ 0.0005 as sufficiently discriminant for being compounds of interest. Volcanoplots with limits set at fold change = ± 2 and p-value = 0.0005 (Figure 7) were performed. Within all these signals, 51 were linked to tolerance in 2020 and 24 in 2021 while for the two years of observation respectively 66 and 41 signals were found to be linked with susceptibility as represented in Venn diagram in Figure 8. This analysis allowed us to select 25 common signals shared between the two years, 9 linked with tolerance and 16 linked with susceptibility. These discriminant signals, as they have been observed on two years, could be related to tolerance and susceptibility against *F. graminearum* with a better confidence. The list of discriminant signals characterized by their accurate mass (m/z) with their putative chemical formula, retention time (min), surface area, ratio, abundance and p-value are resumed in Table 3 for the two years of observation.

Beside all discriminant signals detected, four were putatively identified and their structures are reported in Figure 9. The putative identification of the three compounds of Table 3 P04, P10 and P13 as chlorogenic acid, 3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene and eupatilin respectively was made by comparison with public database using molecular networking on GNPS site (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) and m/z Cloud. Compound P22 was putatively identified as feruloyl-hexose compound as it was the most important signal at this retention time on MS² spectra. The putative feruloyl-hexose mass corresponds to the mass of ferulic acid (P21) present at same retention time conjugated to a hexose with an addition of Na⁺ ion. Ferulic acid has

been set as part of P22 molecule as its signal was present in lower quantity compare to P22. The other derivatives of the putatively identified molecules have been identified based on comparison of mass with compounds of same retention time. All putatively identified compounds P04, P10, P13 and P22 were all related to phenylpropanoids. P10 was more precisely related to pterocarpan, a group of natural isoflavonoids. All other segregating compounds have not yet been identified currently and their MS² spectra did not match to any m/z cloud database spectrum.

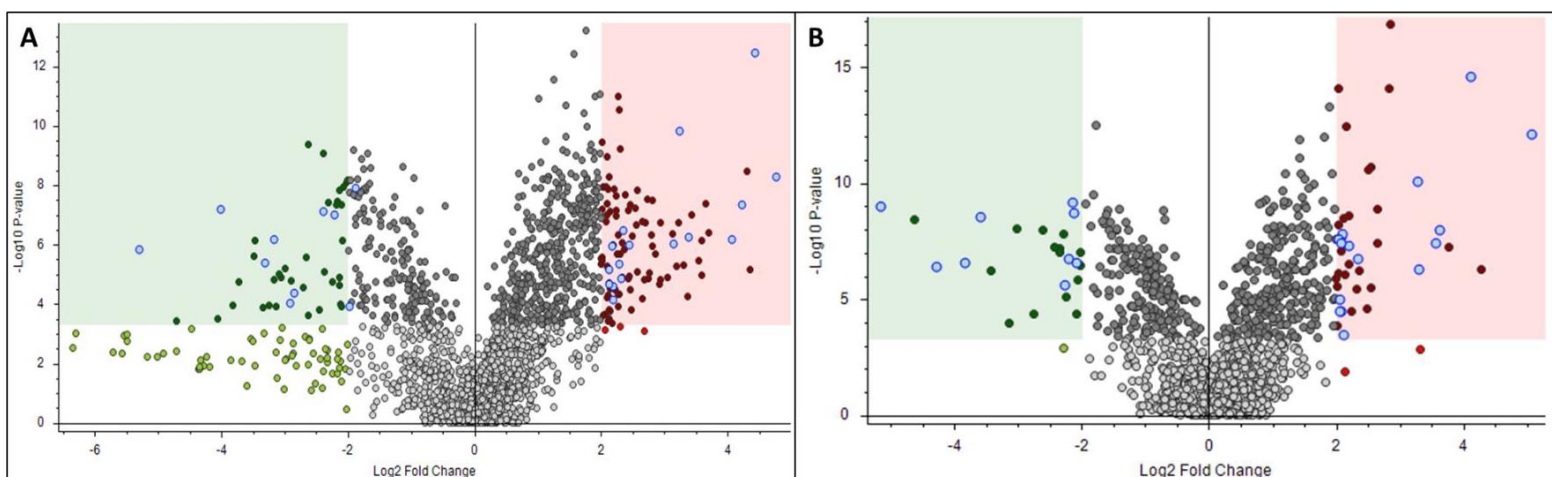


Figure 7. Volcanoplot of the signals detected in the methanolic silk extracts by LC/MS in 2020 and 2021. A: 2819 signals observed in 2020. B: 1789 signals observed in 2021. Blue points represent common signals obtained on the two years of analyses. The dark green points are signals correlated with tolerance with our selected values of confidence. The dark red points are signals correlated with susceptibility. Dark grey points are points with p-values < 0.0005 and foldchange between 2 and -2. Light grey points are signals with p-value > 0.0005. Confidence scale: p-value < 0.0005 and |relative abundance fold change| > 2.

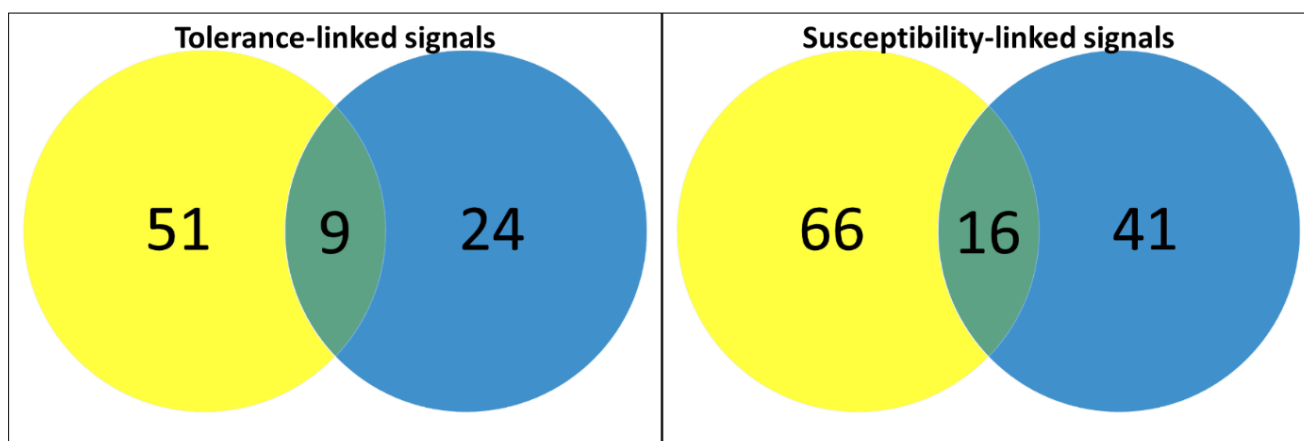


Figure 8. Venn diagram representing the common signals linked with tolerance and susceptibility in our two years of observations. Yellow circles represent discriminating signals found in 2020 and blue circles represent discriminating signals found in 2021.

Table 3. Table of signals found in both 2020 and 2021 years of analysis and discriminant for susceptibility at p-value < 0.0005 and |relative abundance fold change| > 2.

ID	Confidence	Putative ID	Chemical formula (molecular)	[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)		Retention time (min)		Area Max (Arbitrary Unit)		Area ratio S3/S1		Log2 fold change S3/S1		Adj P-value	
				2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021
P01			C7H15NO2	146.1176	146.1177	1.11	1.04	203291986	288858632	8.742	9.925	3.13	3.31	7.10E-03	5.60E-06
P02		2 P06 + Na+	C32H36O18Na+	366.0932	366.0872	2.52	2.58	49896303	22839585	32.091	11.878	5	3.57	2.80E-10	7.70E-07
P03		P04 fragment	C9H8O4	181.0495	181.0496	2.52	2.60	1685654231	1425318203	5.609	4.236	2.49	2.08	1.90E-08	5.60E-07
P04	2	Chlorogenic acid	C16H18O9	355.1020	355.1022	2.52	2.60	1311681876	1484209672	4.461	4.589	2.16	2.2	9.40E-09	9.80E-07
P05		P06 + Na+	C16H18O9Na+	378.0874	378.0874	2.53	2.62	123000922	47412566	5.551	5.065	2.47	2.34	1.10E-09	2.70E-06
P06		P04 isotope	C16H18O9	356.1056	356.1056	2.53	2.63	69594133	205363123	5.884	4.222	2.56	2.08	1.70E-09	8.50E-07
P07		P04 fragment	C9H6O3	163.0389	163.0391	2.54	2.64	1508053229	1274890109	5.519	4.318	2.46	2.11	2.50E-07	4.00E-07
P08			C11H8N6O5	305.0631	305.0633	3.95	3.99	11634383	4659356	4.570	4.374	2.19	2.13	1.00E-03	1.50E-03
P09			C19H25N7O6	448.1936	448.1940	4.40	4.24	49099761	15851864	11.786	12.301	3.56	3.62	1.90E-08	2.90E-07
P10	2	3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene	C16H14O5	287.0913	287.0912	4.86	4.88	10806093	11227186	4.855	9.749	2.28	3.29	1.10E-05	1.00E-08
P11		P10 isomer	C16H14O5	287.0913	287.0913	6.01	6.01	45136189	16812610	30.066	33.769	4.91	5.08	2.80E-10	2.00E-10
P12			C28H30O17	639.1548	639.1555	5.98	6.12	37519109	23581815	3.778	4.132	1.92	2.05	2.50E-03	5.80E-07
P13	2	Eupatilin	C18H16O7	345.0966	345.0967	6.84	6.98	488855987	95130368	22.27	17.413	4.48	4.12	2.20E-05	2.90E-12
P14			C17H26N6O4	379.2087	379.2093	9.86	9.78	299511209	45202461	3.663	4.144	1.87	2.05	1.20E-02	7.00E-05
P15		P16 - Na+	C20H34O6	371.2427	371.2429	11.32	11.19	576737562	231367390	7.497	4.216	2.91	2.08	9.90E-03	2.00E-04
P16			C20H34O6Na+	393.2245	393.2249	11.32	11.19	477346883	151116861	7.56	4.15	2.92	2.05	6.40E-03	2.00E-04
P17			C21H18OP2	349.0891	349.0896	4.32	4.32	99562070	8833734	0.08	0.124	-3.65	-3.01	2.90E-04	2.80E-07
P18			C15H27O5P3	381.1154	381.1155	4.59	4.56	24218136	3711932	0.042	0.231	-3.18	-2.11	2.50E-07	8.70E-08
P19			C49H43N5O18	990.2676	990.2695	4.63	4.64	13944913	9256219	0.167	0.209	-2.59	-2.26	1.40E-06	2.30E-05
P20		P21-HCOOH	C9H8O2	149.0597	149.0599	4.65	4.66	3718057	2721471	0.233	0.228	-2.1	-2.13	1.80E-08	4.90E-08
P21		P22 fragment : Ferulic acid	C10H10O4	195.0652	195.0654	4.65	4.66	424259611	260589463	0.086	0.052	-3.55	-4.28	1.10E-05	4.70E-06
P22	3	Feruloyl-hexose + Na+	C16H20O9Na+	379.0998	379.0998	4.65	4.66	811703342	230087580	0.204	0.219	-2.29	-2.19	6.00E-05	2.70E-06
P23		2 Feruloyl-Hexose + Na+	C32H40O18Na+	735.2101	735.2089	4.65	4.66	64611131	27564711	0.028	0.028	-5.16	-5.17	6.40E-06	6.10E-08
P24			C20H34O6	845.2460	845.2458	4.66	4.68	16442608	4860158	0.089	0.083	-3.49	-3.58	9.40E-06	1.30E-07
P25		P24 + Na+	C20H34O6Na+	990.2686	990.2679	4.81	4.87	85016032	79008393	0.217	0.236	-2.21	-2.09	1.20E-05	3.50E-06

Red-colored signals are found in higher quantity in susceptible genotypes, green-colored signals are found in higher quantity in tolerant genotypes. Confidence level 2 correspond to signal identified by comparison with database with similarity >70%. Confidence level 3 correspond to signal identified by formula and by spectral similarity to known compound. Area corresponds to the area of the chromatographic peak containing the compound ion. Ratios correspond to area in S3 samples / area in S1 samples. P-values were set by ANOVA tests.

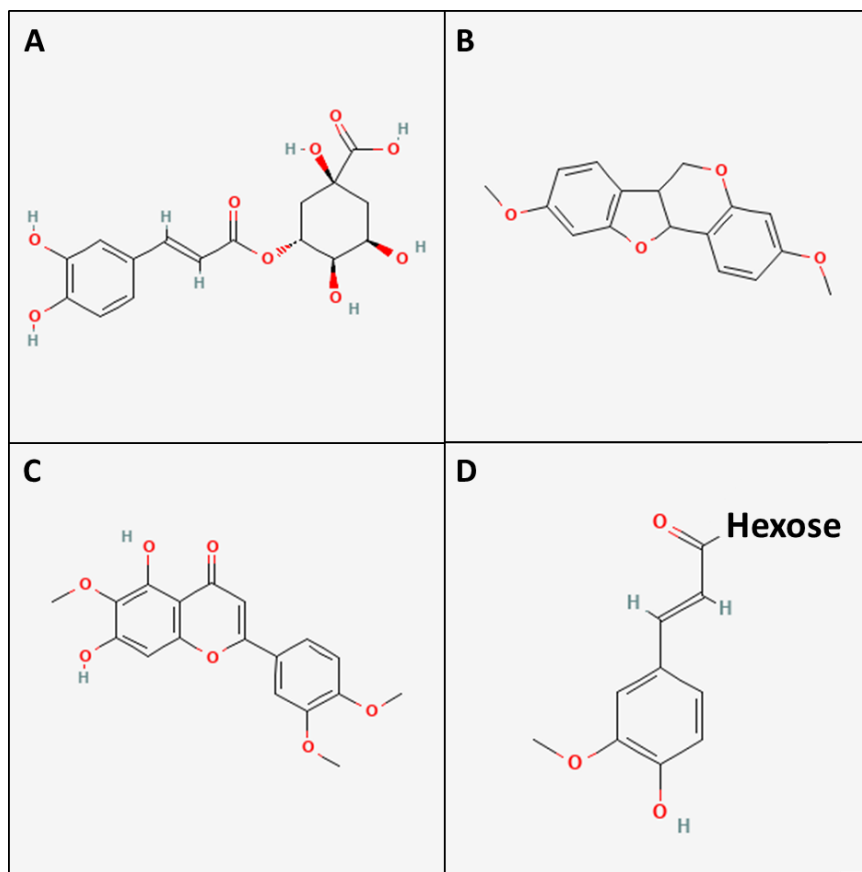


Figure 9. Structures of putatively identified signals of Table 3. A: Chlorogenic acid. B: 3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene. C: Eupatilin. D: Feruloyl-hexose.

Boxplots presented in Figure 10 show the relative abundance of each signal putatively related to a unique compound. All compounds are present in both susceptible and tolerant genotypes indicating that their importance in tolerance is linked to their abundance. For the 14 molecules, abundance ratio is superior to $2 \log_2$ as this value was used as a filter. For P01, P17 and P18 the observed ratios are around 8 and for P09 and P24 around 10. The most important ratio is found for P13 putatively identified as eupatilin with a ratio superior to 16. Among these molecules, the signals of P01, P04 (chlorogenic acid), P08, P09, P10 (3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene), P12, P13 (Eupatilin), P14 and P16 are more abundant in susceptible group of genotypes and; the signals associated with P17, P18, P19, P22 (Feruloyl-hexose) and P24 are more important in tolerant group of genotypes.

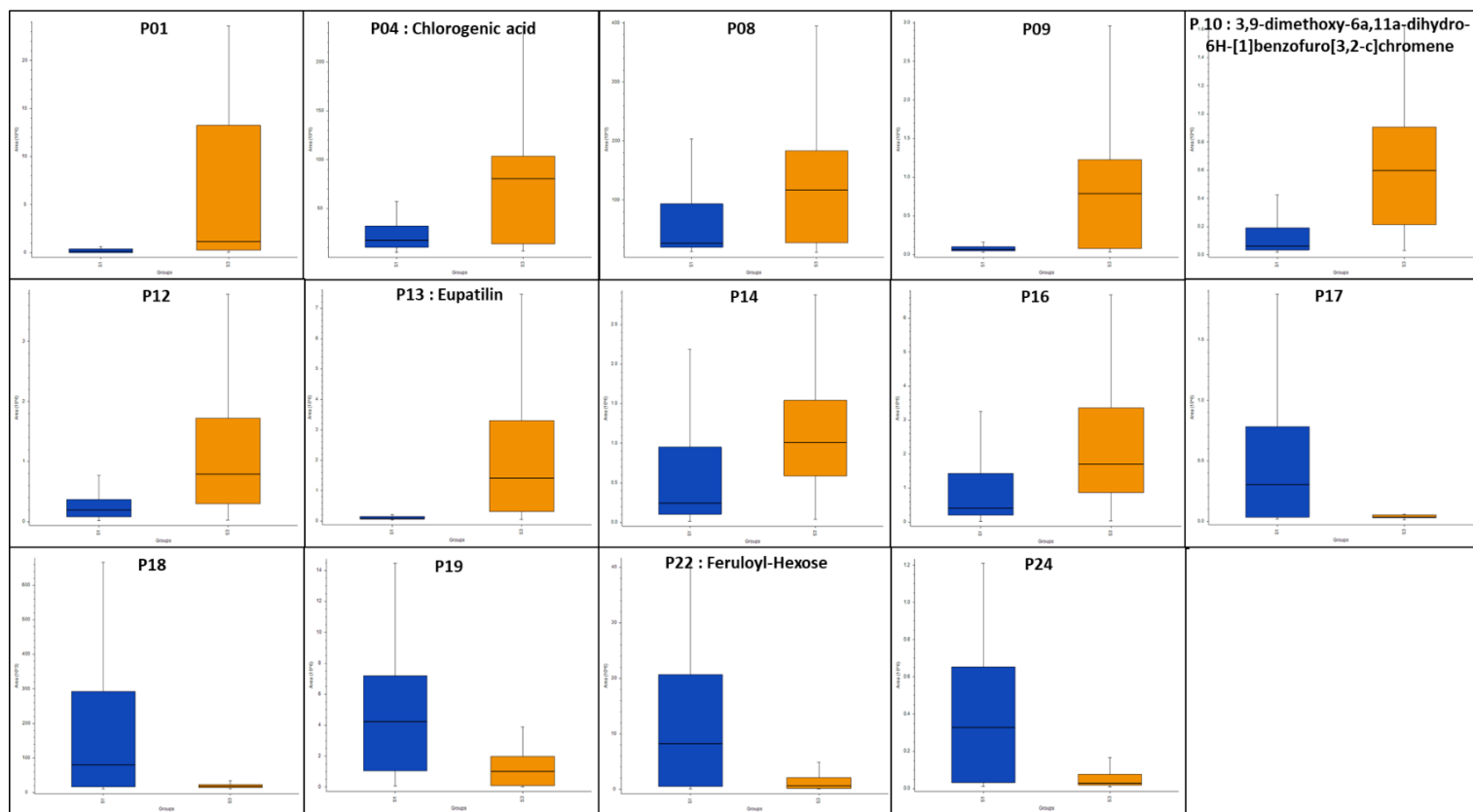


Figure 10. Boxplots of relative abundance of the 14 different representative putative compounds discriminating susceptible and tolerant genotypes in HPLC/MS/MS analyses of methanolic silk extracts. Blues boxes represent the relative abundance in tolerant genotypes and orange boxes the relative abundance in susceptible genotypes. ANOVA was used for statistical analysis. All compounds are significant at p-value < 0.0005.

D- Discussion

While maize silks are considered as the first route of infection of the plant phytopathogen *F. graminearum* that causes the GER fungal disease and are acknowledged as contributing to the genotype resistance (Mesterhazy *et al.* 2020), very few is known regarding the mechanisms underlying the silk-based resistance to GER. In the present study, the biochemical composition of maize silks from a panel of 20 genotypes differing in *F. graminearum* resistance was investigated with the aim to identify some key biochemical compounds that could contribute to prevent or slow down the fungal infection. Only a limited number of studies have addressed the biochemical composition of silks and most of them have been based on targeted analytical strategies. Bioactive molecules with potential benefits for human health, including phenylpropanoids, diterpenoids and alkaloids (Velazquez *et al.* 2005; Guo *et al.* 2009; Nessa *et al.* 2012; Chaiittianan *et al.* 2017; da Hora *et al.* 2021; Basist *et al.* 2022) have been the main focus of the previous reports. Since few decades, metabolomics has emerged as a relevant technology for delivering a comprehensive view of the biochemical composition of plant tissues. Actually, significant improvements in metabolomic approaches have been achieved during the past two decades regarding both the analytical methods and the data handling tools including data

processing software and database management systems (Richard-Forget *et al.* 2021). In the field of maize research, metabolomics has been mainly applied to kernels with the aim to (1) deepen the knowledge of the nutritional value of kernels, (2) decipher the response to biotic and abiotic stresses, (3) assess the genotype and cultivation areas impact (Gálvez Ranilla 2020; Medeiros *et al.* 2021). Among the few studies that have used metabolomics to characterize maize silks, we can mention the report of El-Ghorab *et al.* (El-Ghorab *et al.* 2007) that described the use of GC-MS applied to one silk sample, the work of Wang *et al.* (Wang *et al.* 2019) who have applied a UPHLC-Q-TOF-MS/MS technology to characterize an aqueous extract of silks and the study of Kuhnen *et al.* (Kuhnen *et al.* 2010) who have used HRMN to compare the metabolomic profiles of silks from eight Egyptian maize cultivars. To our knowledge, no comprehensive analysis of silk metabolome as the one performed within the present study had been published before. Here, we provided the characterization of 20 silk metabolomes from 20 maize genotypes grown over two years in a same location using an analytical strategy that combined targeted LC-DAD (for bound phenylpropanoids) and untargeted LC-HRMS (for polar metabolites). Eleven bound phenylpropanoids were characterized and quantified and close to 2000 m/z signals for each cultivation year were analyzed, among which more than 10 % were associated with a putative identification. Ferulic acid and its dimeric forms and *p*-coumaric acid were found as the main phenolic acids occurring in the cell walls of silks, corroborating previously published data (Bily *et al.* 2003; Cao *et al.* 2011; Santiago *et al.* 2013). Among the putatively identified m/z signals, phenylpropanoids (classes of flavonoids, isoflavonoids, cinnamic acids, phenols, coumarins) and their derivatives (classes of cinnamic acid and coumarin derivatives, tannins), followed by fatty acyls, prenol lipids and amino acids were the chemical structures the most frequently proposed by our annotation processes (based on the use of Compound Discoverer® and GNPS softwares). To our opinion, the richness and chemical diversity of our metabolomics data make this metabolic database a first comprehensive source of information for further studies addressing the biology of maize silks. When comparing data from the two years of maize cultivation, great differences were observed supporting the significant influence of environmental conditions on the metabolic compositions of maize silks. Actually, the 2020 year was characterized by very high temperatures and heat waves followed by severe rains while, in 2021, lower temperatures and more stable rain precipitations were noticed. Such an environment effect on metabolic profiles has already been described for other plant tissues and particularly for phenolic acids (Edreva *et al.* 1995; Sharma *et al.* 2019; Mencin *et al.* 2021).

Silk metabolomes were further compared between genotypes characterized as susceptible and tolerant to GER with the aim to investigate the potential contribution of some metabolites to silk-resistance mechanisms to *F. graminearum*. LC-HRMS data were shown to allow a discrimination between susceptible and tolerant genotypes while such a clustering was by far less evident with bound phenolic acids data. 25 m/z signals, among which 14 were predicted as associated with a single

metabolite, were evidenced as discriminants between tolerant and susceptible genotypes for the two years of study. Among these 14 signals, four were putatively identified with confidence levels of 2 or 3: feruloyl-hexose, chlorogenic acid, eupatilin and 3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene. Regarding bound phenolic acids, ferulic acid in both 2020 and 2021 and ferulic acid dimeric forms in 2021 were suggested to contribute to the resistance level. All the discriminating compounds evidenced by our study are gathered in Table 4. It must be kept in mind that the identification of polar compound structures is a putative one that requires to be confirmed using standard compounds. This is particularly true for eupatilin, a bioactive flavonoid compound occurring in *Artemesia* plants (Lee *et al.* 2006), the presence of which in maize has never been reported hitherto. Similarly, the presence of the pterocarpan 3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene, had never been described in maize tissues.

Table 4. Summary of the compounds potentially linked with maize resistance and susceptibility to GER highlighted by the present study

Compounds	Link with tolerance
Bound phenolics	
Ferulic acid	Susceptibility
Ferulic acid dimers	Susceptibility
Soluble polar compounds	
Chlorogenic acid	Susceptibility
3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene	Susceptibility
Eupatilin	Susceptibility
Feruloyl-hexose	Resistance

All the compounds reported in Table 4 were phenylpropanoids and only one, feruloyl-hexose, was associated with GER resistance. This result supports the conclusions of Buanafina and Morris (Buanafina & Morris 2022) who indicated that feruloylation of hydroxycinnamic acids contributed to an increased cell wall resistance and therefore to an increased resistance to plant pests. More surprising was the positive relationship of bound ferulic acid and its dimers and of chlorogenic acid contained in silks with the susceptibility of the maize genotype. Actually, phenolic acids that are linked to the secondary cell-wall structure (Bidlack *et al.* 1992; Santiago *et al.* 2013) and compose lignin monomers are reported to play a key role in cell fortification and in mechanical resistance of plants against pathogen infection. Besides, various phenolic acids occurring in kernels have been suggested to participate to the chemical defense of maize against *Fusarium* species (Gautier *et al.* 2020). Owing the high oxidability of chlorogenic acid and in a less extent of ferulic acid monomer, we could also hypothesize that their abundance in silks from susceptible maize genotypes induced a greater fragility

of silks that could be more prone to fungal infection, the capacity of silks to conserve their integrity being a factor of resistance (Reid *et al.* 1992a; Munkvold 2003). It is worth mentioning here that in their study addressing the role of hydroxycinnamic acids in maize resistance against *F. graminearum*, Cao *et al.* (Cao *et al.* 2011) did not observe any correlation between their composition and quantity in silks and the level of genotype resistance.

The present study is the first report of the potential role of a compound putatively identified as eupatilin in GER resistance. Eupatilin belongs to the class of flavonoids compounds, particularly to the *O*-methylated flavonoids sub-class and has been described as a bioactive compound occurring in *Artemisia* medicinal plants (Seo & Surh 2001). Flavonoids are molecules known for their antifungal properties and have been shown as inhibitor of fungal growth *in vitro* (Ilboudo *et al.* 2016). Moreover, in maize, a recent study has shown that the accumulation of *O*-methylated flavonoids, particularly the xilonenin, was induced by fungal infection at the site of infection and led to the growth inhibition of *F. graminearum* (Förster *et al.* 2022). This antifungal effect is however not in accordance with the observed positive contribution of eupatilin with GER susceptibility. A similar discussion could be applied to the 3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene, a pterocarpan, which in our study was observed in higher quantity in susceptible genotypes. In previous works, pterocarpan have been described as phytoalexins, their biosynthesis being induced by plant pathogens (Jeandet 2015) and have also been reported as efficient antifungal agents (Lattanzio *et al.* 2006; Hasegawa *et al.* 2014). However, to our knowledge, their impact against *Fusarium* species infecting plants has not been investigated so far.

Overall, our study has demonstrated the bright future of metabolomic studies to decipher the composition of maize silks and to highlight the potential contribution of some key metabolites to the susceptibility/resistance to *F. graminearum*. The set of candidate compounds delivered by the present study requires however to be validated: (1) by a confirmation of the predicted structure, (2) the consideration of more genotypes with different genetic background, (3) the analysis of silks from maize cultivated over more than two years and in more diverse environments. Besides, this study was based on a visual phenotyping of maize resistance to GER, combining observations under natural and artificial inoculation, which does not allow to systematically differentiate the type I resistance (related to silk) and type II (related to kernels) (Mesterhazy *et al.* 2020). To give more significance in the analysis of our data, an improved ranking procedure would be necessary. Nevertheless, our study paves the avenue for the use of new approaches based on silk composition to improve the breeding programs aiming at increasing maize resistance to *F. graminearum* and minimizing the contamination of kernels with the deoxynivalenol mycotoxin.

References

- ADOM, K.K. & LIU, R.H. (2002). Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6182–6187.
- ATANASOVA-PENICHON, V., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. (2016). Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to FUSARIUM and Mycotoxin Accumulation. *Frontiers in Microbiology*, **7**.
- AZEVEDO, A.S. DE, SEIBERT, J.B., AMPARO, T.R., ANTUNES, A. DOS S., SOUSA, L.R.D., SOUZA, G.H.B. DE, TEIXEIRA, L.F.M., VIEIRA, P.M. DE A., SANTOS, V.M.R. DOS, NASCIMENTO, A.M. DO & NASCIMENTO, A.M. DO. (2022). Chemical Constituents, Antioxidant Potential, Antibacterial Study and Photoprotective Activity of Brazilian Corn Silk Extract. *Food Science and Technology*, **42**.
- BASIST, P., KHAN, M.U., JAN, B., GAURAV, NULL, KHAN, M.A., PARVEEN, R. & AHMAD, S. (2022). Metabolite Profiling and Nephroprotective Potential of the ZEA MAYS L. Silk Extract against Diclofenac-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats. *ACS omega*, **7**, 36519–36534.
- BIDLACK, J., MALONE, M. & BENSON, R. (1992). Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science (USA)*.
- BILY, A.C., REID, L.M., TAYLOR, J.H., JOHNSTON, D., MALOUIN, C., BURT, A.J., BAKAN, B., REGNAULT-ROGER, C., PAULS, K.P., ARNASON, J.T. & PHILOGÈNE, B.J.R. (2003). Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to FUSARIUM GRAMINEARUM. *Phytopathology*, **93**, 712–719.
- BOUTIGNY, A.-L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M.-N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. (2009). Ferulic Acid, an Efficient Inhibitor of Type B Trichothecene Biosynthesis and Tri Gene Expression in FUSARIUM Liquid Cultures. *Mycological Research*, **113**, 746–753.
- BUANAFINA, M.M. DE O. & MORRIS, P. (2022). The Impact of Cell Wall Feruloylation on Plant Growth, Responses to Environmental Stress, Plant Pathogens and Cell Wall Degradability. *Agronomy*, **12**, 1847.
- CAO, A., REID, L.M., BUTRÓN, A., MALVAR, R.A., SOUTO, X.C. & SANTIAGO, R. (2011). Role of Hydroxycinnamic Acids in the Infection of Maize Silks by FUSARIUM GRAMINEARUM Schwabe. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, **24**, 1020–1026.
- CASAS, M.I., FALCONE-FERREYRA, M.L., JIANG, N., MEJÍA-GUERRA, M.K., RODRÍGUEZ, E., WILSON, T., ENGELMEIER, J., CASATI, P. & GROTEWOLD, E. (2016). Identification and Characterization of Maize salmon silks Genes Involved in Insecticidal Maysin Biosynthesis. *The Plant Cell*, **28**, 1297–1309.
- CHAIITIANAN, R., SUTTHANUT, K. & RATTANATHONGKOM, A. (2017). Purple Corn Silk: A Potential Anti-obesity Agent with Inhibition on Adipogenesis and Induction on Lipolysis and Apoptosis in Adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, **201**, 9–16.
- CHTIOUI, W., BALMAS, V., DELOGU, G., MIGHELI, Q. & OUFENSOU, S. (2022). Bioprospecting Phenols as Inhibitors of Trichothecene-Producing FUSARIUM : Sustainable Approaches to the Management of Wheat Pathogens. *Toxins*, **14**, 72.

- DAS, A.K. & SINGH, V. (2015). Antioxidative Free and Bound Phenolic Constituents in Pericarp, Germ and Endosperm of Indian Dent (ZEA MAYS var. INDENTADA) and Flint (ZEA MAYS var. INDURATA) Maize. *Journal of Functional Foods*, **13**, 363–374.
- EDREVA, A., YORDANOV, I., KARDJIEVA, R., HADJIISKA, E. & GESHEVA, E. (1995). Expression of Phenylamides in Abiotic Stress Conditions. *Bulg. J. Plant Physiol.*, **21**.
- EL-GHORAB, A., EL-MASSRY, K.F. & SHIBAMOTO, T. (2007). Chemical Composition of the Volatile Extract and Antioxidant Activities of the Volatile and Nonvolatile Extracts of Egyptian Corn Silk (ZEA MAYS L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 9124–9127.
- FÖRSTER, C., HANDRICK, V., DING, Y., NAKAMURA, Y., PAETZ, C., SCHNEIDER, B., CASTRO-FALCÓN, G., HUGHES, C.C., LUCK, K., POOSAPATI, S., KUNERT, G., HUFFAKER, A., GERSHENZON, J., SCHMELZ, E.A. & KÖLLNER, T.G. (2022). Biosynthesis and Antifungal Activity of Fungus-induced O-methylated Flavonoids in Maize. *Plant Physiology*, **188**, 167–190.
- GÁLVEZ RANILLA, L. (2020). The Application of Metabolomics for the Study of Cereal Corn (Zea mays L.). *Metabolites*, **10**, 300.
- GAUTIER, C., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. (2020). FUSARIUM Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing Fusarium Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **68**, 4788–4798.
- GUO, J., LIU, T., HAN, L. & LIU, Y. (2009). The Effects of Corn Silk on Glycaemic Metabolism. *Nutrition & Metabolism*, **6**, 47.
- HASANUDIN, K., HASHIM, P. & MUSTAFA, S. (2012). Corn Silk (Stigma maydis) in Healthcare: a Phytochemical and Pharmacological Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **17**, 9697–9715.
- HASEGAWA, M., MITSUHARA, I., SEO, S., OKADA, K., YAMANE, H., IWAI, T. & OHASHI, Y. (2014). Analysis on Blast Fungus-Responsive Characters of a Flavonoid Phytoalexin Sakuranetin; Accumulation in Infected Rice Leaves, Antifungal Activity and Detoxification by Fungus. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **19**, 11404–11418.
- DA HORA, N.R.S., SANTANA, L.F., DA SILVA, V.D.A., COSTA, S.L., ZAMBOTTI-VILLELA, L., COLEPICOLO, P., FERRAZ, C.G. & RIBEIRO, P.R. (2021). Identification of Bioactive Metabolites from Corn Silk Extracts by a Combination of Metabolite Profiling, univariate statistical analysis and chemometrics. *Food Chemistry*, **365**, 130479.
- HU, Q.-L., ZHANG, L.-J., LI, Y.-N., DING, Y.-J. & LI, F.-L. (2010). Purification and Anti-Fatigue Activity of Flavonoids from Corn Silk. *International Journal of Physical Sciences*, **5**, 321–326.
- ILBOUDO, O., BONZI, S., TAPSOBA, I., SOMDA, I. & BONZI-COULIBALY, Y.L. (2016). In Vitro Antifungal Activity of Flavonoid Diglycosides of MENTHA PIPERITA and their Oxime Derivatives Against Two Cereals Fungi. *Comptes Rendus Chimie*, **19**, 857–862.
- INCREMENTONA, M.E., PILAR GONZALEZ, M. DEL, PIOLI, R.N. & SALINAS, A.R. (2014). Infection of Maize Silks by a Native FUSARIUM (FUSARIUM GRAMINEARUM) Isolate in Argentina. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, ex Agro-Ciencia*, **30**, 203–211.
- JEANDET, P. (2015). Phytoalexins: Current Progress and Future Prospects. *Molecules*, **20**, 2770–2774.

- KUHNEN, S., BERNARDI OGLIARI, J., DIAS, P.F., DA SILVA SANTOS, M., FERREIRA, A.G., BONHAM, C.C., WOOD, K.V. & MARASCHIN, M. (2010). Metabolic Fingerprint of Brazilian Maize Landraces Silk (Stigma/Styles) Using NMR Spectroscopy and Chemometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 2194–2200.
- LATTANZIO, V., LATTANZINO, V.M.T. & CARDINALI, A. (2006). Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants Against Fungal Pathogens and Insects. , **661**, 23–67.
- LEE, Y.-W., JIN, Y. & ROW, K.H. (2006). Extraction and Purification of Eupatilin from Artemisia Princeps PAMPAN Recycling Preparative HPLC. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **23**, 279–282.
- MEDEIROS, D.B., BROTMAN, Y. & FERNIE, A.R. (2021). The Utility of Metabolomics as a Tool to Inform Maize Biology. *Plant Communications*, **2**, 100187.
- MENCIN, M., ABRAMOVIČ, H., JAMNIK, P., MIKULIČ PETKOVŠEK, M., VEBERIČ, R. & TERPINC, P. (2021). Abiotic Stress Combinations Improve the Phenolics Profiles and Activities of Extractable and Bound Antioxidants from Germinated Spelt (*TRITICUM SPELTA* L.) Seeds. *Food Chemistry*, **344**, 128704.
- MESTERHAZY, A., TOLDINE TOTH, E., SZEL, S., VARGA, M. & TOTH, B. (2020). Resistance of Maize Hybrids to *FUSARIUM GRAMINEARUM*, *F. CULMORUM*, and *F. VERTICILLIOIDES* Ear Rots with Toothpick and Silk Channel Inoculation, as Well as Their Toxin Production. *Agronomy*, **10**, 1283.
- MUNKVOLD, G.P. (2003). Cultural and Genetic Approaches to Managing Mycotoxins in Maize. *Annual Review of Phytopathology*, **41**, 99–116.
- NESSA, F., ISMAIL, Z. & MOHAMED, N. (2012). Antimicrobial Activities of Extracts and Flavonoid Glycosides of Corn Silk (*ZEA MAYS* L). *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, **1**, 115–120.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BOUTIGNY, A.-L., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. (2011). Cinnamic-Derived Acids Significantly Affect *Fusarium graminearum* Growth and In Vitro Synthesis of Type B Trichothecenes. *Phytopathology*[®], **101**, 929–934.
- RAJESHWARI, H. & SIVAPRIYA, T. (2021). Analysis of Nutrients, Phytochemicals, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Corn Silk Extract (*Zea mays* L. Stigma). *International Journal of Health & Allied Sciences*, **10**, 275.
- REID, L.M., MATHER, D.E., ARNASON, J.T., HAMILTON, R.I. & BOLTON, A.T. (1992a). Changes in Phenolic Constituents of Maize Silk Infected with *FUSARIUM GRAMINEARUM*. *Canadian Journal of Botany*, **70**, 1697–1702.
- REID, L.M., MATHER, D.E., HAMILTON, R.I. & BOLTON, A.T. (1992b). Genotypic Differences in the Resistance of Maize Silk to *FUSARIUM GRAMINEARUM*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **14**, 211–214.
- RICHARD-FORGET, F., ATANASOVA, V. & CHÉREAU, S. (2021). Using Metabolomics to Guide Strategies to Tackle the Issue of the Contamination of Food and Feed with Mycotoxins: A Review of the Literature with Specific Focus on *FUSARIUM* Mycotoxins. *Food Control*, **121**, 107610.
- SANTIAGO, R., BARROS-RIOS, J. & MALVAR, R.A. (2013). Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 6960–6980.
- SCHÖNEBERG, T., KIBLER, K., SULYOK, M., MUSA, T., BUCHELI, T.D., MASCHER, F., BERTOSSA, M., VOEGELE, R.T. &

- VOGELGSANG, S. (2018). Can Plant Phenolic Compounds Reduce FUSARIUM Growth and Mycotoxin Production in Cereals? *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, **35**, 2455–2470.
- SEO, H.-J. & SURH, Y.-J. (2001). Eupatilin, a Pharmacologically Active Flavone Derived from Artemisia Plants, Induces Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **496**, 191–198.
- SHARMA, A., SHAHZAD, B., REHMAN, A., BHARDWAJ, R., LANDI, M. & ZHENG, B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, **24**, 2452.
- SINGH, J., INBARAJ, B.S., KAUR, S., RASANE, P. & NANDA, V. (2022). Phytochemical Analysis and Characterization of Corn Silk (ZEA MAYS, G5417). *Agronomy*, **12**, 777.
- SUMNER, L.W., AMBERG, A., BARRETT, D., BEALE, M.H., BEGER, R., DAYKIN, C.A., FAN, T.W.-M., FIEHN, O., GOODACRE, R., GRIFFIN, J.L., HANKEMEIER, T., HARDY, N., HARNLY, J., HIGASHI, R., KOPKA, J., LANE, A.N., LINDON, J.C., MARRIOTT, P., NICHOLLS, A.W., REILY, M.D., THADEN, J.J. & VIANI, M.R. (2007). Proposed Minimum Reporting Standards for Chemical Analysis. *Metabolomics*, **3**, 211–221.
- THOMPSON, M.E.H. & RAIZADA, M.N. (2018). Fungal Pathogens of Maize Gaining Free Passage Along the Silk Road. *Pathogens*, **7**, 81.
- VELAZQUEZ, D.V.O., XAVIER, H.S., BATISTA, J.E.M. & DE CASTRO-CHAVES, C. (2005). ZEA MAYS L. Extracts Modify Glomerular Function and Potassium Urinary Excretion in Conscious Rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, **12**, 363–369.
- WANG, Y., LIU, Q., FAN, S., YANG, X., MING, L., WANG, H. & LIU, J. (2019). Rapid Analysis and Characterization of Multiple Constituents of Corn Silk Aqueous Extract Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Combined with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Separation Science*, **42**, 3054–3066.
- YE, J., GUO, Y., ZHANG, D., ZHANG, N., WANG, C. & XU, M. (2013). Cytological and Molecular Characterization of Quantitative Trait Locus qRfg1, Which Confers Resistance to GIBBERELLA Stalk Rot in Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], **26**, 1417–1428.
- ŽILIĆ, S., JANKOVIĆ, M., BASIĆ, Z., VANČETOVIĆ, J. & MAKSIMOVIĆ, V. (2016). Antioxidant Activity, Phenolic Profile, Chlorophyll and Mineral Matter Content of Corn Silk (ZEA MAYS L): Comparison with Medicinal Herbs. *Journal of Cereal Science*, **69**, 363–370.

Supplementary Table 2. Average concentration of phenols for each genotype on the two years of observations. All results are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry maize silks.

Name	Susceptibility	Protocatechuic acid	Benzoic acid	Chlorogenic acid	Caffeic/Vanillic acid	P-coumaric acid	<i>trans</i> -Ferulic acid	<i>cis</i> -Ferulic acid	8-5'DiFA	5-5'DiFA	8-O-4'DiFA	8-5'BenDiFA	Total phenolic acids
G1	S1	12.74 ± 11.16	18.94 ± 23.77	5.62 ± 10.18	11.78 ± 6.53	285.77 ± 65.55	4184.04 ± 1789.01	80.45 ± 73.98	31.47 ± 26.22	24.16 ± 19.93	48.20 ± 56.46	54.41 ± 54.03	4757.61 ± 1839.43
G2	S1	8.43 ± 3.97	8.52 ± 0.91	2.60 ± 3.66	10.97 ± 4.15	315.27 ± 79.13	3235.34 ± 1379.46	119.02 ± 90.49	28.89 ± 20.91	19.79 ± 20.91	42.93 ± 49.99	67.96 ± 74.71	3859.72 ± 1244.88
G3	S1	10.54 ± 7.44	8.35 ± 3.11	2.30 ± 2.85	10.31 ± 4.44	286.99 ± 84.09	5719.06 ± 2340.89	105.36 ± 82.30	20.74 ± 14.97	20.43 ± 22.11	47.86 ± 44.51	43.29 ± 51.59	6275.26 ± 2422.79
G4	S1	20.35 ± 13.82	16.42 ± 9.04	7.71 ± 10.24	14.51 ± 7.17	326.26 ± 44.93	3029.90 ± 1927.38	47.44 ± 38.74	30.06 ± 25.44	27.73 ± 24.13	57.54 ± 60.33	63.08 ± 60.30	3640.99 ± 1829.84
G5	S1	21.02 ± 17.14	13.42 ± 3.54	3.25 ± 5.42	9.57 ± 5.27	229.31 ± 94.74	5281.01 ± 2576.16	143.62 ± 127.97	29.58 ± 19.66	11.13 ± 8.51	14.05 ± 8.68	22.11 ± 7.77	5778.08 ± 2690.81
G6	S3	15.46 ± 16.29	3.22 ± 1.76	1.74 ± 2.46	9.22 ± 7.47	212.64 ± 100.87	6140.64 ± 3340.99	155.24 ± 152.46	26.29 ± 24.38	15.08 ± 15.53	75.31 ± 85.09	69.92 ± 91.94	6724.75 ± 3699.73
G7	S3	16.52 ± 5.78	11.12 ± 3.70	11.95 ± 9.76	23.56 ± 4.56	544.37 ± 106.16	9063.33 ± 3241.67	225.85 ± 166.93	28.69 ± 20.34	25.81 ± 18.44	55.40 ± 54.85	77.68 ± 68.25	10079.30 ± 2953.03
G8	S3	11.37 ± 5.50	8.46 ± 2.53	4.07 ± 3.90	23.69 ± 10.25	326.13 ± 35.41	6284.11 ± 2279.80	285.55 ± 246.28	22.28 ± 18.07	24.02 ± 18.97	30.00 ± 35.93	40.05 ± 40.97	7059.72 ± 2091.28
G9	S3	8.87 ± 5.81	6.35 ± 2.37	4.21 ± 4.92	15.09 ± 9.79	244.46 ± 77.05	4180.99 ± 1859.08	185.63 ± 258.59	13.10 ± 15.48	10.70 ± 7.57	14.99 ± 9.18	20.94 ± 9.81	4705.36 ± 1874.04
G10	S3	8.25 ± 5.03	7.35 ± 1.75	2.34 ± 3.84	13.79 ± 9.12	305.98 ± 62.17	6679.85 ± 2252.47	228.32 ± 195.44	28.11 ± 19.95	15.26 ± 7.47	20.02 ± 7.17	24.95 ± 4.63	7334.22 ± 2167.97
G11	S3	10.69 ± 7.26	7.33 ± 2.79	3.59 ± 4.61	25.75 ± 15.51	280.47 ± 94.85	7321.29 ± 5280.07	353.13 ± 357.75	23.65 ± 16.71	36.22 ± 38.95	54.23 ± 56.85	64.33 ± 61.88	8180.71 ± 5126.69
G12	S1	9.65 ± 10.72	11.47 ± 7.81	16.25 ± 18.63	12.92 ± 7.05	413.21 ± 108.69	4303.25 ± 2718.36	84.37 ± 89.88	23.94 ± 19.67	20.12 ± 16.97	43.73 ± 43.92	53.81 ± 48.02	4992.72 ± 2685.32
G13	S1	9.25 ± 6.54	8.31 ± 4.66	3.04 ± 2.55	11.69 ± 6.18	231.66 ± 101.91	6568.82 ± 3664.26	136.99 ± 148.29	25.39 ± 25.53	21.12 ± 12.63	23.59 ± 16.49	31.58 ± 16.16	7071.45 ± 3776.19
G14	S3	6.34 ± 5.00	8.45 ± 5.39	5.87 ± 8.86	12.19 ± 7.75	330.08 ± 181.21	3757.05 ± 2487.92	91.89 ± 121.16	19.57 ± 22.79	18.02 ± 27.01	44.43 ± 70.51	65.62 ± 96.51	4359.51 ± 2753.99
G15	S1	6.68 ± 6.20	7.14 ± 4.23	10.80 ± 12.79	11.11 ± 6.28	319.29 ± 195.41	5059.91 ± 3809.43	70.34 ± 73.46	14.75 ± 14.67	12.62 ± 11.27	26.67 ± 31.06	43.87 ± 58.09	5579.56 ± 3998.98
G16	S3	6.71 ± 4.03	15.42 ± 6.41	8.64 ± 12.42	9.30 ± 3.67	191.20 ± 51.11	5386.58 ± 2773.33	111.03 ± 88.59	47.11 ± 31.36	40.36 ± 28.13	92.45 ± 90.73	87.79 ± 88.34	5996.59 ± 2734.67
G17	S3	18.26 ± 16.78	2.07 ± 1.90	3.19 ± 3.78	6.83 ± 6.56	95.73 ± 98.09	6294.97 ± 3855.73	22.34 ± 17.87	7.14 ± 7.51	15.15 ± 13.79	21.35 ± 21.72	20.76 ± 21.67	7930.50 ± 2887.71
G18	S1	6.51 ± 4.86	4.94 ± 4.21	0.88 ± 1.59	12.49 ± 11.69	206.23 ± 132.71	4160.56 ± 3846.28	66.38 ± 61.40	24.57 ± 24.99	13.23 ± 12.08	12.65 ± 10.35	16.79 ± 13.06	4524.93 ± 3958.85
G19	S1	17.78 ± 6.88	3.90 ± 1.39	4.32 ± 2.80	22.27 ± 6.75	209.15 ± 70.37	7975.50 ± 2554.45	167.08 ± 196.53	24.09 ± 31.85	16.18 ± 7.76	16.33 ± 5.28	22.79 ± 13.72	8478.43 ± 2749.14
G20	S3	14.34 ± 7.00	30.14 ± 49.79	14.41 ± 13.76	22.97 ± 10.13	475.26 ± 42.86	4283.71 ± 1865.24	94.85 ± 77.02	55.68 ± 40.69	37.99 ± 29.17	165.70 ± 174.16	117.15 ± 109.10	5314.79 ± 1825.45

Supplementary Table 2. Compounds putatively identified by Compound discoverer analysis.

Feature ID	Putative ID	Chemical Formula (molecular)	[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Class	2020	2021
PSCD18	5'-S-Methyl-5'-thioadenosine isomer A	C11 H15 N5 O3 S	298.0967	0.968	5'-deoxyribonucleosides	Detected	Not detected
PSCD36	5'-S-Methyl-5'-thioadenosine isomer B	C11 H15 N5 O3 S	298.0967	4.107	5'-deoxyribonucleosides	Detected	Detected
PSCD12	S-Adenosylmethionine isomer A	C15 H22 N6 O5 S	399.1441	0.792	5'-deoxyribonucleosides	Detected	Not detected
PSCD17	S-Adenosylmethionine isomer B	C15 H22 N6 O5 S	399.1441	0.966	5'-deoxyribonucleosides	Detected	Not detected
PSCD3	Asparagine	C4 H8 N2 O3	133.0609	0.627	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD5	D-(+)-Pyroglutamic Acid	C5 H7 N O3	130.0501	0.629	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD10	DL-Arginine isomer A	C6 H14 N4 O2	175.1191	0.696	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD14	DL-Arginine isomer B	C6 H14 N4 O2	175.1190	0.857	Aminoacids	Detected	Not detected
PSCD6	DL-Glutamine isomer A	C5 H10 N2 O3	147.0764	0.636	Aminoacids	Detected	Not detected
PSCD7	DL-Glutamine isomer B	C5 H9 N O4	148.0604	0.636	Aminoacids	Detected	Not detected
PSCD27	DL-Tryptophan	C11 H12 N2 O2	205.0972	2.698	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD2	L-Aspartic acid	C4 H7 N O4	134.0447	0.621	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD4	L-Glutamic acid isomer A	C5 H9 N O4	148.0606	0.628	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD11	L-Glutamic acid isomer B	C5 H9 N O4	148.0605	0.763	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD8	L-Glutamine	C5 H10 N2 O3	147.0766	0.639	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD9	L-Histidine isomer A	C6 H9 N3 O2	156.0769	0.690	Aminoacids	Detected	Detected
PSCD13	L-Histidine isomer B	C6 H9 N3 O2	156.0767	0.833	Aminoacids	Detected	Not detected
PSCD15	Urocanic acid	C6 H6 N2 O2	139.0504	0.922	Azoles	Detected	Detected
PSCD42	Myristicin	C11 H12 O3	193.0860	4.311	Benzodioxoles	Detected	Not detected
PSCD32	Methyl cinnamate	C10 H10 O2	163.0754	3.550	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSCD44	Isoferulic acid	C10 H10 O4	195.0653	4.656	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Detected
PSCD34	Sinapinic acid isomer A	C11 H12 O5	225.0759	3.712	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSCD47	Sinapinic acid isomer B	C11 H12 O5	225.0759	4.777	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Detected
PSCD23	Thiamine	C12 H16 N4 O S	265.1117	1.203	Diazines	Detected	Not detected
PSCD94	(2E,4E,10Z)-N-Isobutyl-2,4,10-hexadecatrieneamide	C20 H35 N O	306.2790	9.437	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSCD65	(4E,6E)-2-(hydroxymethyl)-3-(3-methoxy-3-oxopropyl)deca-4,6-dienoic acid	C15 H24 O5	285.1696	5.769	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSCD96	12-oxo Phytodienoic Acid isomer A	C18 H28 O3	293.2111	10.765	Fatty Acyls	Detected	Detected
PSCD97	12-oxo Phytodienoic Acid isomer B	C18 H28 O3	293.2109	10.987	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSCD101	12-oxo Phytodienoic Acid isomer C	C18 H28 O3	293.2110	11.479	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSCD105	12-oxo Phytodienoic Acid isomer D	C18 H28 O3	293.2111	12.928	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSCD91	5-[5-(methoxycarbonyl)-5,8a-dimethyl-2-methylidene-decahydronaphthalen-1-yl]-3-methylpentanoic acid isomer A	C21 H34 O4	351.2530	8.712	Fatty Acyls	Detected	Detected
PSCD93	5-[5-(methoxycarbonyl)-5,8a-dimethyl-2-methylidene-decahydronaphthalen-1-yl]-3-methylpentanoic acid isomer B	C21 H34 O4	351.2530	9.263	Fatty Acyls	Detected	Detected
PSCD95	5-[5-(methoxycarbonyl)-5,8a-dimethyl-2-methylidene-decahydronaphthalen-1-yl]-3-methylpentanoic acid isomer C	C21 H34 O4	351.2530	10.319	Fatty Acyls	Detected	Detected
PSCD98	5-[5-(methoxycarbonyl)-5,8a-dimethyl-2-methylidene-decahydronaphthalen-1-yl]-3-methylpentanoic acid isomer D	C21 H34 O4	351.2529	10.994	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSCD102	9-Oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid	C18 H30 O3	295.2266	12.094	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSCD107	Oleamide	C18 H35 N O	282.2792	14.541	Fatty Acyls	Detected	Not detected

Feature ID	Putative ID	Chemical Formula (molecular)	[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Class	2020	2021
PSCD52	Eriodictyol isomer A	C15 H12 O6	289.0706	5.199	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD62	Eriodictyol isomer B	C15 H12 O6	289.0705	5.685	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD75	Eriodictyol isomer C	C15 H12 O6	289.0705	6.198	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD54	Diosmetin isomer A	C16 H12 O6	301.0704	5.338	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD74	Diosmetin isomer B	C16 H12 O6	301.0705	6.185	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD82	Diosmetin isomer C	C16 H12 O6	301.0701	6.467	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD90	Diosmetin isomer D	C16 H12 O6	301.0703	8.264	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD57	Luteolin isomer A	C15 H10 O6	287.0549	5.500	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD77	Luteolin isomer B	C15 H10 O6	287.0549	6.209	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD48	2-(4-Hydroxyphenyl)-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-one	C21 H22 O9	419.1335	4.778	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD69	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one isomer A	C16 H14 O6	303.0862	5.832	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD58	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-one isomer B	C16 H14 O6	303.0862	5.504	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD61	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6,8-bis(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)-4H-chromen-4-one	C25 H26 O13	535.1447	5.668	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD71	5,7-dihydroxy-6-methoxy-2-(4-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]phenyl]-4H-chromen-4-one isomer A	C22 H22 O11	463.1230	6.076	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD84	5,7-dihydroxy-6-methoxy-2-(4-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]phenyl]-4H-chromen-4-one isomer B	C22 H22 O11	463.1232	6.567	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD72	5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methoxy-7-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-4H-chromen-4-one isomer A	C23 H24 O12	493.1340	6.173	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD80	5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methoxy-7-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-4H-chromen-4-one isomer B	C23 H24 O12	493.1338	6.397	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD86	5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methoxy-7-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-4H-chromen-4-one isomer C	C23 H24 O12	493.1341	6.692	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD73	5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-7-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]-4H-chromen-4-one	C22 H22 O11	463.1232	6.185	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD88	Eupatilin	C18 H16 O7	345.0968	6.983	Flavonoids	Not detected	Detected
PSCD55	Orientin isomer A	C21 H20 O11	449.1078	5.402	Flavonoids	Not detected	Detected
PSCD79	Orientin isomer B	C21 H20 O11	449.1078	6.336	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD83	Orientin isomer C	C21 H20 O11	449.1077	6.482	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD85	Orientin isomer D	C21 H20 O11	449.1079	6.640	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD56	Pectolinarigenin isomer A	C17 H14 O6	315.0856	5.477	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD87	Pectolinarigenin isomer B	C17 H14 O6	315.0861	6.878	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD30	Prunin isomer A	C21 H22 O10	435.1282	3.271	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD31	Prunin isomer B	C21 H22 O10	435.1283	3.519	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD38	Prunin isomer C	C21 H22 O10	435.1284	4.195	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD45	Prunin isomer D	C21 H22 O10	435.1284	4.693	Flavonoids	Not detected	Detected
PSCD50	Prunin isomer E	C21 H22 O10	435.1284	4.960	Flavonoids	Detected	Detected
PSCD51	Prunin isomer F	C21 H22 O10	435.1282	5.188	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD60	Quercetin isomer A	C15 H10 O7	303.0497	5.642	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD67	Quercetin isomer B	C15 H10 O7	303.0497	5.801	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD59	Quercetin-3β-D-glucoside isomer A	C21 H20 O12	465.1024	5.641	Flavonoids	Detected	Not detected
PSCD70	Quercetin-3β-D-glucoside isomer B	C21 H20 O12	465.1028	5.900	Flavonoids	Not detected	Detected

Feature ID	Putative ID	Chemical Formula (molecular)	[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)	Retention time (min)	Class	2020	2021
PSCD64	Rutin	C27 H30 O16	611.1607	5.745	Flavonoids	Not detected	Detected
PSCD68	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[[2S,3R,4R,5S,6R]-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-8-[[2S,3R,4R,5R,6S]-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]-4H-chromen-4-one	C27 H30 O14	579.1706	5.817	Flavonoids	Not detected	Detected
PSCD19	Guanine isomer A	C5 H5 N5 O	152.0568	1.013	Imidazopyrimidines	Not detected	Detected
PSCD22	Guanine isomer B	C5 H5 N5 O	152.0567	1.153	Imidazopyrimidines	Detected	Not detected
PSCD28	trans-3-Indoleacrylic acid	C11 H9 N O2	188.0707	2.699	Indoles and derivatives	Detected	Detected
PSCD63	3'-hydroxy Puerarin isomer A	C21 H20 O10	433.1132	5.696	Isoflavonoids	Detected	Detected
PSCD66	3'-hydroxy Puerarin isomer B	C21 H20 O10	433.1132	5.793	Isoflavonoids	Detected	Detected
PSCD49	Genistin isomer C	C21 H20 O10	433.1128	4.901	Isoflavonoids	Detected	Not detected
PSCD37	Genistin isomer A	C21 H20 O10	433.1128	4.159	Isoflavonoids	Detected	Not detected
PSCD46	Genistin isomer B	C21 H20 O10	433.1131	4.694	Isoflavonoids	Detected	Detected
PSCD20	S-Adenosylhomocysteine	C14 H20 N6 O5 S	385.1287	1.097	Lactones	Detected	Not detected
PSCD106	Linoleoyl Ethanolamide	C20 H37 N O2	324.2896	13.018	Organonitrogen compounds	Detected	Not detected
PSCD99	6-Gingerol isomer A	C17 H26 O4	295.1903	11.034	Phenols	Detected	Not detected
PSCD103	6-Gingerol isomer B	C17 H26 O4	295.1902	12.460	Phenols	Detected	Not detected
PSCD104	6-Gingerol isomer C	C17 H26 O4	295.1903	12.741	Phenols	Detected	Not detected
PSCD41	Rubrofusarin 6-gentiobioside	C27 H32 O15	597.1811	4.292	Phenols	Detected	Detected
PSCD16	Spermidine	C7 H19 N3	146.1652	0.951	Polyamines	Detected	Not detected
PSCD92	(4aS,5R,6S,8aS)-5-[(3E)-5-methoxy-3-methyl-5-oxopent-3-en-1-yl]-5,6,8a-trimethyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalene-1-carboxylic acid	C21 H32 O4	349.2372	8.852	Polyketides	Detected	Not detected
PSCD100	1,4a-dimethyl-9-oxo-7-(propan-2-yl)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylic acid	C20 H26 O3	315.1954	11.217	Polyketides	Detected	Not detected
PSCD76	Aflatoxin B1	C17 H12 O6	313.0705	6.209	Polyketides	Detected	Not detected
PSCD53	Aflatoxin G1 isomer A	C17 H12 O7	329.0654	5.237	Polyketides	Detected	Not detected
PSCD78	Aflatoxin G1 isomer B	C17 H12 O7	329.0654	6.210	Polyketides	Detected	Not detected
PSCD81	Aflatoxin G1 isomer C	C17 H12 O7	329.0654	6.450	Polyketides	Detected	Not detected
PSCD24	Adenosine	C10 H13 N5 O4	268.1038	1.346	Purine nucleosides	Detected	Not detected
PSCD21	Nicotinamide	C6 H6 N2 O	123.0554	1.100	Pyridines and derivatives	Detected	Not detected
PSCD43	(2E)-3-(4-methoxy-2-[[[2S,3R,4S,5S,6R]-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]phenyl)prop-2-enoic acid	C16 H20 O9	357.1177	4.646	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSCD26	Caffeoylquinic acid isomer A	C16 H18 O9	355.1022	2.602	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSCD40	Caffeoylquinic acid isomer B	C16 H18 O9	355.1022	4.228	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSCD25	Chlorogenic acid	C16 H18 O9	355.1021	2.517	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSCD33	Coumaroyl quinic acid isomer A	C16 H18 O8	339.1073	3.621	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSCD35	Coumaroyl quinic acid isomer B	C16 H18 O8	339.1073	3.766	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSCD1	D-Glucose 6-phosphate	C6 H13 O9 P	261.0370	0.587	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSCD39	Feruloylquinic acid	C17 H20 O9	369.1180	4.227	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSCD89	(3aS,5aR,6R,9aS,9bS)-6-hydroxy-5a-methyl-3,9-dimethylidene-dodecahydronaphtho[1,2-b]furan-2-one	C15 H20 O3	249.1485	7.359	Sesquiterpene	Not detected	Detected
PSCD29	Vanillic acid glucoside	C14 H18 O9	331.1021	3.124	Tannins	Detected	Not detected

Supplementary Table 3. Compounds putatively identified by GNPS analysis.

Feature ID	Putative ID	Retention time (min)		[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)		INCHI KEY	Class	2020	2021
		2020	2021	2020	2021				
PSGNPS8	S-Adenosyl-L-methionine	0.97	0.72	399.14	399.14	MEFKEPWMEQBLKI-AIRLBKGTSA-N	5'-deoxyribonucleosides	Detected	Detected
PSGNPS33	Methylthioadenosine	4.23	4.10	298.1	298.1	WUUGFSXJNOTRMR-UHFFFAOYSA-N	5'-deoxyribonucleosides	Detected	Detected
PSGNPS10	S-(5'-ADENOSYL)-L-HOMOCYSTEINE	1.10		385.13		ZJUKTBDSGOFHSH-WFMPWKQPSA-N	5'-deoxyribonucleosides	Detected	Not detected
PSGNPS66	fucosyltransferase V	5.82	5.83	429.17	429.17	HSWIRQIYASIOBE-JNHRPPPUSA-N	Anthracenes	Detected	Detected
PSGNPS86	fucosyltransferase V	6.83		453.21		HSWIRQIYASIOBE-JNHRPPPUSA-N	Anthracenes	Detected	Not detected
PSGNPS41	[(2R,3S,4S,5R,6S)-6-(3,4-dihydroxybenzoyloxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)methyl-3,4-dihydroxybenzoate	4.87		451.12		VNQNUULCMPXFER-XDCWJTEKSA-N	Benzene and substituted derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS111	Benzyltetradecyldimethylammonium	9.50		331.19		WNBGVYXHTYOBY-UHFFFAOYSA-N	Benzene and substituted derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS116	Methyl (E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl]oxyphenyl]-3-methoxyprop-2-enoate	10.07		404.13		WFDXOXFNFRHQEC-GHRIWEIEISA-N	Benzene and substituted derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS21	PHENETHYLAMINE	2.50		122.55		BHHGXPLMPWCQHP-UHFFFAOYSA-N	Benzene and substituted derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS101	Cyprodinil	8.80		227.92		HAORKNGNJCEJXB-UHFFFAOYSA-N	Benzene and substituted derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS105	Sulfamethazine 4-amino-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzenesulfonamide	9.15		279.11		ASWVTGNCAZCNR-UHFFFAOYSA-N	Benzene and substituted derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS88	4-hydroxy-7-methyl-2-[2-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxypropan-2-yl]-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-5-one	7.10		439.14		KHWKLNMXSVVKCH-UHFFFAOYSA-N	Benzopyrans	Detected	Not detected
PSGNPS122	N-(2-hydroxyethyl)dodecanamide	10.87		244.23		QZXSMBFBXPOHI-UHFFFAOYSA-N	Carboximide acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS55	Histidine	0.67	0.67	156.07	156.07	HNDVDQJICGZPNO-UHFFFAOYSA-N	Carboxylic acids and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS94	2-amino-3-prop-2-enylsulfanylpropanoic acid	7.82		214.09		XUHLIQGRKRUKPH-UHFFFAOYSA-N	Carboxylic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS97	2-amino-3-prop-2-enylsulfanylpropanoic acid	8.17		214.09		XUHLIQGRKRUKPH-UHFFFAOYSA-N	Carboxylic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS159	2-amino-3-prop-2-enylsulfanylpropanoic acid		0.55		214.09	XUHLIQGRKRUKPH-UHFFFAOYSA-N	Carboxylic acids and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS132	MoNA:2248333 O-((Aminoiminomethyl)amino)-L-homoserine	11.42		173.16		FSBIGDSBMBYOPN-VKHMHEASA-N	Carboxylic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS113	3-(Dodecanoylamino)propyl((carboxymethyl)dimethylammonium carboxymethyl-3-(dodecanoylamino)propyl)-dimethylazanium	9.90		343.3		MRUAUOIMASANKQ-UHFFFAOYSA-O	Carboxylic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS84	Paprazine	6.82	6.82	284.13	284.13	RXGUTQNKCXHALN-UHFFFAOYSA-N	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS174	3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid		4.77		225.08	PCMORTLOPMLFEB-ONEGZNMKSA-N	Cinnamic acids and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS89	Diferuloyl putrescine	7.12		441.2		CHEMZHQCXVLFU-UHFFFAOYSA-N	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS38	Feruloyl putrescine	4.60	4.68	265.15	265.15	SFUVCMKSYKHYLD-UHFFFAOYSA-N	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS175	SINAPIC ACID		4.83		207.06	PCMORTLOPMLFEB-UHFFFAOYSA-N	Cinnamic acids and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS23	Chlorogenic acid	2.53		355.1		CWVRJTMFETXNAD-UHZZAGLSA-N	Cinnamic acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS69	4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one	5.98		449.13		VAPVFUWBNBLVMB-CMWLGVBASA-N	Coumarins and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS179	8-hydroxy-6-methoxy-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one		5.47		369.15	RVVWDDKOKZKCI-ZOLYHUHESA-N	Coumarins and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS198	Hymecromone		13.98		199.28	HSHNITRMYYLLCV-UHFFFAOYSA-N	Coumarins and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS12	THIAMINE	1.18		265.11		JZRWCGRZRTMZEH-UHFFFAOYSA-N	Diazines	Detected	Not detected
PSGNPS129	(3R,4S,5S,6R)-2-(6-hydroxy-2,6-dimethylocta-2,7-dienoxy)-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	11.25		332.11		WEHZDNHJZBEGME-SPGNZJCFSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS189	(Z)-2-octylpent-2-enedioic acid		8.27		244.19	NIXDINZDFZJZHG-LUAWRHEFSA-N	Fatty Acyls	Not detected	Detected
PSGNPS98	Brassylic acid	8.22		244.19		DXNCZXXFRKPEPY-UHFFFAOYSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS202	NCGC00385642-01		14.97		313.24	LUIGTZGBXWZJAX-UHFFFAOYSA-N	Fatty Acyls	Not detected	Detected
PSGNPS104	Aleuretic Acid	9.03		304.26		MEHUJCGAYMDLEL-LSDHHAIUSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS121	(+/-)-5,6-Dihydroxy-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid	10.67	10.57	339.22	339.22	GFNYAPAUJNPMGH-QNEBEIHSSA-N	Fatty Acyls	Detected	Detected
PSGNPS127	NCGC00380283-01	11.17	11.28	478.29	478.29	VJQANBSDAGCDJE-UHFFFAOYSA-N	Fatty Acyls	Detected	Detected
PSGNPS193	Lauryl diethanolamide		10.57		288.25	AOMUHOFOVNGZAN-UHFFFAOYSA-N	Fatty Acyls	Not detected	Detected
PSGNPS147	13-Keto-9Z,11E-octadecadienoic acid	12.98		275.66		JHXAZBBVQSRKRJ-BSZOFBHHSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS35	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-[4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-yloxy]oxane-3,4,5-triol	4.25		478.19		QJVVGSWLOLQDG-PROUKMOUSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS72	NCGC00380190-01	6.02		458.26		ZPUOWQZPFUNIS-JIKMCCCNESA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS187	gamma-linolenic acid		7.57		281.18	VZCCEWTMQHEPK-QNEBEIHSSA-N	Fatty Acyls	Not detected	Detected
PSGNPS136	linoleic acid	11.83		304.67		OYHQQLKZRVRUHQ-UHFFFAOYSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS95	Avocadyne Acetate	8.07		342.8		JAKAZHIACKJNNB-UHFFFAOYSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS134	Avocadyne Acetate	11.60		342.76		JAKAZHIACKJNNB-UHFFFAOYSA-N	Fatty Acyls	Detected	Not detected
PSGNPS19	3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanone (Fustin)	2.42	2.47	289.07	289.07	FNUPUYFWZXMIE-LSDHHAIUSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNPS44	Eriodictyol-7-O-glucoside	4.95	4.97	449.14	449.14	RAFHNDRXYHOLSH-RGHIGTISA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNPS52	Eriodictyol-7-O-glucoside	5.47		449.14		RAFHNDRXYHOLSH-RGHIGTISA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNPS47	Flavanomarein	5.12	5.20	473.11	473.11	DGGOLFPCSUUVHX-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNPS65	Homoeriodictyol	5.80	5.83	303.09	303.09	FTODBPDTXRIGS-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNPS76	6-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	6.07		601.15		BGPMMPSTAYIEL-UTKQBCEASA-N	Flavonoids	Detected	Not detected

Feature ID	Putative ID	Retention time (min)		[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)		INCHI KEY	Class	2020	2021
		2020	2021	2020	2021				
PSGNP580	7-hydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	6.40	6.47	493.13	493.13	FLSOTPIEFVBPBU-LDBVRRDLA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP543	Anomalovicenin	4.93		581.15		LXDFBARENKGGHR-SLSRKFMSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP5178	Anomalovicenin		5.03		581.15	LXDFBARENKGGHR-SLSRKFMSA-N	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP546	Eriodictyol	5.12	5.17	289.05	289.07	SBHXHTNGIZCORC-ZDUSSCGKA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP5199	Carpachromene		14.23		358.4	YXOATFKTEDZPFL-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP550	homoorientin	5.28		449.11		ODBRNZJSPIDI-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP548	Isoschaftoside	5.17	5.25	565.15	565.15	OVMFVONXASTPA-VYUBKLTSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP583	Isovitexin 2''-O-arabinoside	6.62	6.73	601.15	601.15	ACRIYKEXCQOS-XAYOXWHSSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP560	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one	5.58	5.67	433.11	433.11	MYXNWGACZJSMBT-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP567	luteolin-7-glucoside	5.83	6.00	449.11	449.11	PEFNSGRTCBGNAN-QNDFHXLGSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP5112	NCGC00163589-02	9.87		448.57		PEFNSGRTCBGNAN-QNDFHXLGSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP582	NCGC00384927-01	6.57	7.05	615.15	615.17	AOXGLJSLZQONZ-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP562	NCGC00385129-01	5.72	5.82	579.17	579.17	MVOUGOXRXODXC-RSPRXDBDSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP5135	NCGC00385199-01	11.60		628.4		XKAYFELZCPZDEK-IPOZFMPSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP573	Diosmetin	6.05	6.17	301.07	301.07	MBNGWHJMBWFFHU-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP5100	Diosmetin	8.58		301.07		MBNGWHJMBWFFHU-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP539	NP-006989(12)	4.60		611.16		ZLPSOQFIIQIAX-FCSQLNSJSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP549	Swertisin	8.25		449.11		ABRULANJVJLFI-DGHBABESA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP596	Tricin	5.15		331.08		HRGUSFBJBOKSML-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP555	Luteolin	5.50		287.06		IQPNAANSBPBGFQ-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP5188	Luteolin		7.62		287.06	IQPNAANSBPBGFQ-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP561	Vitexin-2''-O-rhamnoside	5.58		579.17		LYGPBZVKGHHTIE-HUBYJIGHSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP551	[(2R,3S,4S,5R,6S)-3,4-dihydroxy-6-[3,7,8-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxochromen-5-yl]oxy-5-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]methyl acetate	5.38	5.57	683.14	683.14	KBHXFAMQPWWLFT-NUXWGMRISA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP5184	3,4,5-trihydroxy-6-[5-(5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-methoxy-4-oxochromen-7-yl]oxyoxane-2-carboxylic acid		6.28		507.11	IHGAMZBDEOTTEW-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP599	Astragalin	8.52		449.33		JPUKWEQWGBDDQB-QSOFNFLRSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP5181	Astragalin		5.92		449.11	JPUKWEQWGBDDQB-QSOFNFLRSA-N	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP5182	Astragalin		6.07		449.11	JPUKWEQWGBDDQB-QSOFNFLRSA-N	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP577	CCG-208508	6.07		485.11		OPJZLUXFQFYAI-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP5183	NCGC00168946-02		6.12		609.14	OFKKUHGXUNAUKP-CQNMNSRFSAN	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP5153	nicotiflorin	13.93		633.45		RTATXGUCZHCNSG-QHWHWDPRSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP5149	Quercetin	13.22		301.26		REFJWTPEDVJJIY-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP590	Quercetin-3-O-galactoside	7.13		463.18		OVSQVDMCBVZVGM-DTGRPFNSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP5180	5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-7-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-4-one		5.73		611.16	OFKKUHGXUNAUKP-CQNMNSRFSAN	Flavonoids	Not detected	Detected
PSGNP558	Syringetin-3-O-glucoside	5.52		507.15		JMFWYRWPIJVEZPV-AVGVHVDKSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP570	Delphinidin-3-rutinoside	5.98		609.14		PLKUTZNSKRWCCA-LTSKFBHWSA-O	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP554	Petunidin-3-O-beta-glucoside	5.48	5.62	477.14	477.14	CCQDWIRWIKWIKK-QKYBYQKWSA-O	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP563	Isoquercitin	5.78	6.17	465.1	463.12	OPJZLUXFQFYAI-GNPVFZCLSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP575	Isoquercitin	6.07	5.90	463.12	465.1	OPJZLUXFQFYAI-GNPVFZCLSA-N	Flavonoids	Detected	Detected
PSGNP564	Quercetin	5.78		303.05		REFJWTPEDVJJIY-UHFFFAOYSA-N	Flavonoids	Detected	Not detected
PSGNP5130	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 3-(hexopyranosyloxy)-2-hydroxypropyl ester, (9Z,12Z,15Z)-	11.25		532.35		HUSISCENTLUEZCN-PDBXOOCHSA-N	Glycerolipids	Detected	Not detected
PSGNP5194	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 3-(hexopyranosyloxy)-2-hydroxypropyl ester, (9Z,12Z,15Z)-		11.17		532.35	HUSISCENTLUEZCN-PDBXOOCHSA-N	Glycerolipids	Not detected	Detected
PSGNP5115	Monopalmitolein (9c)	10.02	10.98	311.26	313.24	KVYUBFKSKZWZSV-FPLPWBNSA-N	Glycerolipids	Detected	Detected
PSGNP5196	Monopalmitolein (9c)		12.27		313.24	KVYUBFKSKZWZSV-FPLPWBNSA-N	Glycerolipids	Not detected	Detected
PSGNP5200	Monopalmitolein (9c)		14.32		313.24	KVYUBFKSKZWZSV-FPLPWBNSA-N	Glycerolipids	Not detected	Detected
PSGNP5106	Monogalactosylmonoacylglycerol	9.28		513.31		OBLUCMMNMFFITHB-LTKCOYKYSAN	Glycerolipids	Detected	Not detected
PSGNP5190	Monogalactosylmonoacylglycerol		9.27		513.31	OBLUCMMNMFFITHB-LTKCOYKYSAN	Glycerolipids	Not detected	Detected
PSGNP5139	1-(9Z-Octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	11.95	14.05	480.31	522.36	YAMUFLWGGFFICM-PTGWMXDISA-N	Glycerophospholipids	Detected	Detected
PSGNP5125	1-Myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	11.00		468.31		VXUOFDIKYGDUJI-OAQLYSRUSA-N	Glycerophospholipids	Detected	Not detected
PSGNP5126	1-O-hexadecyl-2-C-methyl-3-phosphatidylcholine	11.05		494.32		BZLKOORCGCYQJZ-UHFFFAOYSA-N	Glycerophospholipids	Detected	Not detected
PSGNP5195	1-O-hexadecyl-2-C-methyl-3-phosphatidylcholine		11.60		494.3	BZLKOORCGCYQJZ-UHFFFAOYSA-N	Glycerophospholipids	Not detected	Detected
PSGNP5120	1-Stearyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	10.57		544.46		IHNKQIMGVNPMTC-RUZDITTESA-N	Glycerophospholipids	Detected	Not detected

Feature ID	Putative ID	Retention time (min)		[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)		INCHI KEY	Class	2020	2021
		2020	2021	2020	2021				
PSGNPS4	L-alpha-Glycerolphosphorylcholine	0.62	0.63	258.11	258.09	SUHQQUVVVLLNYQR-MRVPVSSYSA-N	Glycerophospholipids	Detected	Detected
PSGNPS143	Lyso-PC(16:0)	12.37		496.34		ASWBNKHCGZGQVIV-HSZRFAPSA-N	Glycerophospholipids	Detected	Not detected
PSGNPS81	4',6-Dimethoxyisoflavone-7-O-.beta.-D-glucopyranoside	6.42		463.12		YLYJXNTZVUEFJZ-CIAQSOCLSA-N	Isoflavonoids	Detected	Not detected
PSGNPS78	7-O-beta-glucopyranosyl-4'-hydroxy-5-methoxyisoflavone	6.12		449.11		KSVVGBSBNPMXJF-RECXWGBSA-N	Isoflavonoids	Detected	Not detected
PSGNPS176	3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene		4.97		287.09	VPGIGLKLFCOWDN-UHFFFAOYSA-N	Isoflavonoids	Not detected	Detected
PSGNPS177	NCGC00384603-01		4.97		287.09	VPGIGLKLFCOWDN-UHFFFAOYSA-N	Isoflavonoids	Not detected	Detected
PSGNPS124	dabinal	10.98		463.13		MYQAATJJDGOMQ-AYPBNUJASA-N	Isoflavonoids	Detected	Not detected
PSGNPS156	angoletin	14.75		337.25		HBRYKWADRULHU-UHFFFAOYSA-N	Linear 1,3-diarylpropanoids	Detected	Not detected
PSGNPS40	Licodione base + 2Prenyl	4.83		409.15		FFPFIAFZXSXGDK-UHFFFAOYSA-N	Linear 1,3-diarylpropanoids	Detected	Not detected
PSGNPS154	6,10a-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-4,7,11b-trimethyl-1,2,3,4a,5,6,6a,7,11,11a-decahydronaphtho[2,1-f][1]benzofuran-9-one	13.95		374.21		LLKIVVHUJOPYIV-UHFFFAOYSA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS119	STROBILACTONE A	10.53		288.22		ITJJDWFGMAIKB-PKIAMQTDSA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS185	quercetin 7-O-glucopyranoside		6.50		463.12	BBFYUPYFXSSMNV-LHNMFMVSA-N	N/A	Not detected	Detected
PSGNPS137	eudesmin	11.85		402.36		PEUUVVGGQVMSAW-RZTYQLBFA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS79	(Z)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxooxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	6.15		471.09		QOIHIEPTNMSM-WMZFJQQLSA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS110	(2R,6S)-2-methyl-6-[[3Z]-pentadec-3-en-1-yl]piperidine	9.48		309.22		MQXBADSGHYCSEG-JWVMMJHTSA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS192	(2R,6S)-2-methyl-6-[[3Z]-pentadec-3-en-1-yl]piperidine		10.45		309.24	MQXBADSGHYCSEG-JWVMMJHTSA-N	N/A	Not detected	Detected
PSGNPS7	5'-Deoxyadenosine	0.83		332.89		XGYIMTFOTBMPFP-KQYXXCUSA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS164	guanosine		1.02		284.1	NYHBOVMGNKIUF-UHFFFAOYSA-N	N/A	Not detected	Detected
PSGNPS103	Loratadine	8.93		381.23		JCCNYMKQOSZNPW-UHFFFAOYSA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS13	Adenosine	1.33		268.1		OIRDQYFTABOOQ-KQYXXCUSA-N	N/A	Detected	Not detected
PSGNPS142	Sodium Tetradecyl Sulfate	12.03		316.32		UPUIQIQVMNQAP-UHFFFAOYSA-M	Organic sulfuric acids and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS118	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	10.43		371.19		XMSXQFUHVRWGNA-UHFFFAOYSA-N	Organometallic compounds	Detected	Not detected
PSGNPS151	Lauryldiethanolamine [2-dodecyl(2-hydroxyethyl)amino]ethanol	13.83		274.27		NKFNBMJTSYZDN-UHFFFAOYSA-N	Organonitrogen compounds	Detected	Not detected
PSGNPS145	Phytosphingosine	12.73		318.25		AERBNVCYBRYDG-KSZLROESA-N	Organonitrogen compounds	Detected	Not detected
PSGNPS32	(1R,3R,4S,5R)-1,3,4-trihydroxy-5-[(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoyl]oxycyclohexane-1-carboxylic acid	4.18		391.1		RAGZUCNPULUL-QKJPSVFA-N	Organooxygen compounds	Detected	Not detected
PSGNPS22	(1r,3R,4s,5S)-4-[[{(2E)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoyl]oxy}-1,3,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	2.52	2.58	377.08	377.08	GYFFKZTYAFCTR-UCEFVAKBSA-N	Organooxygen compounds	Detected	Detected
PSGNPS29	(1r,3R,4s,5S)-4-[[{(2E)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoyl]oxy}-1,3,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	4.08	4.25	377.08	377.08	GYFFKZTYAFCTR-UCEFVAKBSA-N	Organooxygen compounds	Detected	Detected
PSGNPS171	(Z)-3-[4-methoxy-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]prop-2-enoic acid		4.52		374.14	FQWZGEBZLOECT-QEQKPWIDSA-N	Organooxygen compounds	Not detected	Detected
PSGNPS87	feruloyltyramine	7.00	6.98	314.14	314.14	NPNKDKMSXVRADT-WEVVVXLSNA-N	Phenols	Detected	Detected
PSGNPS53	[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] (2E,6E)-8-hydroxy-2,6-dimethylacta-2,6-dienoate	5.48	5.45	364.2	364.2	QZIOPIOUZGGXKI-KOYXEPTDSA-N	Prenol lipids	Detected	Detected
PSGNPS56	[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] (2E,6E)-8-hydroxy-2,6-dimethylacta-2,6-dienoate	5.52		383.13		QZIOPIOUZGGXKI-KOYXEPTDSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS197	NEROL		13.90		172.31	GLZPCQOZEFWAFX-YFHOESVSA-N	Prenol lipids	Not detected	Detected
PSGNPS203	NEROL		14.97		173.1	GLZPCQOZEFWAFX-YFHOESVSA-N	Prenol lipids	Not detected	Detected
PSGNPS85	Murolladie-3-One	6.82		219.17		LMILVXQXGKTFZ-UHFFFAOYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS148	(4R,4aS,6R)-4,4a-dimethyl-6-prop-1-en-2-yl-3,4,5,6,7,8-hexahydronaphthalen-2-one	13.00		219.17		WTOYNNBCKU-YIKC-JMSVASOKSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS91	6-Hydroxy-5a-methyl-3,9-bis(methylene)decahydronaphtho[1,2-b]furan-2(3H)-one	7.37		231.14		FKBUODICGDOIGB-UHFFFAOYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS146	Grayanotoxin I	12.85		429.32		NXCXYBJXJWWMRY-VGBBEZPXSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS45	Cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid, 1-(beta-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-4a-hydroxy-7-methyl-5-oxo-, 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl ester, (1S,4aR,7aR)-	5.02		531.2		KBDOXLBZVFTQTMH-RXRQAHPVSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS26	geniposidic acid	3.72		397.11		ZJDOESGVOWAULF-OGJQONSISA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS71	Methyl (1S,4aS,6R,7R,7aR)-1-(beta-D-glucopyranosyloxy)-5,6-dihydroxy-7-methyl-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylate	6.02		429.17		QDEYKGBMCIYCT-PHINXLAUSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS138	14-(hydroxymethyl)-5,9-dimethyltetracyclo[11.2.1.0?,??.0?,?]?hexadecane-5-carbaldehyde	11.93		343.19		ACXLVKYMINUFD-UHFFFAOYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS131	14-hydroxy-14-(hydroxymethyl)-5,9-dimethyltetracyclo[11.2.1.0?,??.0?,?]?hexadecane-5-carboxylic acid	11.38		338.59		MRBLTWPEPRGXQN-UHFFFAOYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS123	[(1R,2S,3S,4R,4aS)-2,3-dihydroxy-3,4a,8,8-tetramethyl-4-[(E)-3-oxobut-1-enyl]-2,4,5,6,7,8a-hexahydro-1H-naphthalen-1-yl] acetate	10.92		392.8		BNOWPELKBYSHKU-GFZHNTHISA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS140	[(1R,2S,3S,4R,4aS)-2,3-dihydroxy-3,4a,8,8-tetramethyl-4-[(E)-3-oxobut-1-enyl]-2,4,5,6,7,8a-hexahydro-1H-naphthalen-1-yl] acetate	12.00		374.36		BNOWPELKBYSHKU-GFZHNTHISA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS109	(1R,4aS,5R,8aS)-5-(5-hydroxy-3-methylpentyl)-1,4a-dimethyl-6-methylidene-3,4,5,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalene-1-carboxylic acid	9.43		342.11		NSRKLZKJLQJLD-KXBJDJWJSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS141	9-hydroxy-5b,8,11a-trimethyl-1-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,5,6,7,7a,9,10,11,11b,12,13,13a,13b-hexadecahydrocyclopenta[a]chrysen-3a,5a,8-tricarboxylic acid	12.00		556.93		FTGKHGAVFGGOMW-UHFFFAOYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS102	Thymol-beta-D-glucoside	8.87	8.85	349.24	349.21	GKQGIQVSMCHAFX-IBEDNSVSA-N	Prenol lipids	Detected	Detected
PSGNPS107	14-(hydroxymethyl)-5,9-dimethyltetracyclo[11.2.1.0?,??.0?,?]?hexadecane-5-ol	9.32		308.76		LZAZGZDVFQSCFO-UHFFFAOYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS155	9-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-propan-2-yl-2,3,4,9,10,10a-hexahydrophenanthrene-1-carboxylic acid	14.68		354.56		GPFVBJYXFRIOFB-UHFFFAOYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS2	Baccatin III	0.52		610.18		OVMSOFCBDBVLFW-VHLQTGQHS-A	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS157	(3S,4R,6aR,6bS,8aS,11R,12R,12aS,14bR)-3,12-dihydroxy-4,6a,6b,11,12,14b-hexamethyl-8a-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxycarbonyl-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,11,12a,14,14a-tetradecahydropicen-4-carboxylic acid	14.85		850.25		LCQFYEBJTAIMPC-PVSIORMYSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected

Feature ID	Putative ID	Retention time (min)		[M+H] ⁺ accurate mass (m/z)		INCHI KEY	Class	2020	2021
		2020	2021	2020	2021				
PSGNPS144	(3S,4R,6A,6bS,8aS,11R,12R,14bR)-3,12-dihydroxy-4,6a,6b,11,12,14b-hexamethyl-8a-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxycarbonyl-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,11,12a,14,14a-tetradecahydronicene-4-carboxylic acid	12.55		702.23		AWFZJSUJFUBZQU-FZECDDVSA-N	Prenol lipids	Detected	Not detected
PSGNPS42	RIBOFLAVIN	4.87		377.14		AUNGANRZHJBGYP-SCRDCRAPSA-N	Pteridines and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS14	2'-Deoxyadenosine	1.50		252.11		OLXZPDWKRNYJZ-RKCRQDMSA-N	Purine nucleosides	Detected	Not detected
PSGNPS117	Austinoneol	10.25		415.21		RVCGYSNUNXICAF-UHFFFAOYSA-N	Pyrans	Detected	Not detected
PSGNPS17	Isonicotinic acid	2.03		122.55		TWBWYOBDOCUKOW-UHFFFAOYSA-N	Pyridines and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS165	Isonicotinic acid		1.05		122.55	TWBWYOBDOCUKOW-UHFFFAOYSA-N	Pyridines and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS11	Niacin	1.18		122.55		PVNIIMVLHYAWGP-UHFFFAOYSA-N	Pyridines and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS9	Pyridoxal	0.97		168.07		RADKZDMFGJYCB-UHFFFAOYSA-N	Pyridines and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS16	pyridoxal	1.83		150.06		RADKZDMFGJYCB-UHFFFAOYSA-N	Pyridines and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS27	PYRIDOXINE	3.75		191.45		LXNHLLTXMVMWPM-UHFFFAOYSA-N	Pyridines and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS1	Uridine diphosphate glucose	0.50	0.55	584.09	584.09	HSCJRCZFDQWRP-JZMIEKBBSA-N	Pyrimidine nucleotides	Detected	Detected
PSGNPS92	aloinin	7.37		433.18		KFJNVJUIKJKEQ-LQDZTQBFSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS20	Paeonolide	2.47		485.13		IDZZECHGWAZTIB-UHFFFAOYSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS170	(1R,3R,4S,5R)-1,3,4-Trihydroxy-5-(((2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoyl)oxy)cyclohexanecarboxylic acid		4.25		391.1	RAGZUCNPTLULQ-LKQJBSFVSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS158	(1S,3R,4S,5R)-4-(((2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl)oxy)-1,3,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	14.97		355.1		GYFFKZTYAFCTR-JUHZACGLSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS30	(E)-3-[4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]prop-2-enoic acid	4.10	4.07	344.13	344.13	LJFYQZQAUALRDF-FDGSXQBSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS57	4-Allyl-2-(beta-D-glucopyranosyloxy)phenyl beta-D-glucopyranoside	5.52		498.17		SFQLDKSMEHBZRN-LWZURRPSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS25	Cyclohexanecarboxylic acid, 1,3,4-trihydroxy-5-(((2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl)oxy)-, (1R,3R,4S,5R)-	3.70	3.78	361.09	361.09	BMRSEYFENKXDIS-QHAYPTCMSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS169	Cyclohexanecarboxylic acid, 1,3,4-trihydroxy-5-(((2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl)oxy)-, (1R,3R,4S,5R)-		3.82		339.11	BMRSEYFENKXDIS-QHAYPTCMSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS31	Cyclohexanecarboxylic acid, 1,3,5-trihydroxy-4-(((2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl)oxy)-, (1alpha,3alpha,4alpha,5beta)-	4.17	4.25	369.12	369.12	VTMFDJSJVNQXL-KSQYBWRXSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS172	NCGC00168941-08		4.62		372.13	CWVRJTMFETXNAD-JUHZACGLSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS168	NCGC00180861-02		2.95		355.1	GYFFKZTYAFCTR-JUHZACGLSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS160	D-myo-Inositol-1,2-diphosphate		0.55		341	MCKAJXMRULSUKI-FTYOSCRSSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS15	Pantothenate (R)-Pantothenate Pantothenic acid D-(+)-Pantothenic acid	1.73	1.63	220.12	220.12	GHOKWGTUJEAQD-ZETCQYMHSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS162	Sucrose		0.75		361.17	CZMRCDWAGMRECN-UGDNZRGBSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS18	TREHALOSE	2.40		366.08		HDTRYLNUVZCQOY-LIZSDCNHSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS163	Melibiose		0.78		365.11	DLRVLDZNNYCBX-ZZFZYMBESA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS201	MUCIC ACID		14.95		209.15	DSLZVSRJYRBFBD-UHBMQHGSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS37	Eleutheroside B	4.30		395.13		QJXXWHHAMZTBY-UHFFFAOYSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS114	3,6,9,12-Tetraoxatetracosan-1-ol Tetraethylene glycol monododecyl ether 2-[2-[2-(2-dodecoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethanol	10.00	10.80	363.23	364.62	WPMWEFCXCYCISA-UHFFFAOYSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS150	3,6,9,12-Tetraoxatetracosan-1-ol Tetraethylene glycol monododecyl ether 2-[2-[2-(2-dodecoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethanol	13.32		363.36		WPMWEFCXCYCISA-UHFFFAOYSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS3	ALPHA-D-GALACTOSE 1-PHOSPHATE	0.55		261.04		HXXFSFRBOHSIMQ-FPRJGLDSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS161	ALPHA-D-GALACTOSE 1-PHOSPHATE		0.57		261.04	HXXFSFRBOHSIMQ-FPRJGLDSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS6	Sorbitol	0.70	0.67	219.04	200.04	FBPFTZCFMRRESA-JGWLITMVA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS36	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[3-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	4.27	4.27	377.08	376.43	REHZRVNHQFBAF-YLHHEPAUSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS24	trans-Zeatin-9-glucoside	3.58		382.09		VYRAJOITMBSQSE-UHFFFAOYSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS59	Trans-Zeatin-9-glucoside	5.52		383.13		VYRAJOITMBSQSE-HNVSNYHQSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS133	sweroside	11.48		357.26		VSJGJMKNMDCI-ZASXJUAOSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS93	[(2R,3S,4S,5R,6R)-6-[(2S,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)methyl 4-hydroxybenzoate	7.55		483.22		CDTIMEVVBGLIF-OVUASUNJSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS186	beta-D-Fructofuranosyl 6-O-(4-hydroxybenzoyl)-alpha-D-glucopyranoside		7.57		483.22	CDTIMEVVBGLIF-OVUASUNJSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS108	Talaromycin A	9.35		263.22		VDWRKBZMQNPUOB-WISYIIOYSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS28	(2S,3R,4S,5S,6R)-2-[4-(3-hydroxybutyl)phenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	3.83	3.77	346.15	346.15	SCUSKAVTYFDOEU-YLHHEPAUSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Detected
PSGNPS166	2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 2-(beta-D-glucopyranosyloxy)-7-methoxy-, (2R)-		2.45		360.09	PMBZSEAOIYRMW-XFWGRBSCSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS152	N-[4,5-dihydroxy-2-[[4-(hydroxy(phenyl)methyl)-5-oxo-3-phenyl-2H-furan-2-yl]oxy]-6-(methoxymethyl)oxan-3-yl]acetamide	13.83		519.14		UCFGUMMLHWLLKJ-UHFFFAOYSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS128	N-Acetylmuramic Acid	11.22		331.2		MNLRQHNMZILPY-MDMHTWEWSA-N	Quinic acid and derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS167	NCGC00380819-01		2.45		377.12	VLHQGQCFBCKMVM-RSQMQNDGSA-N	Quinic acid and derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS68	Ouabain	5.87		587.14		LPMXVSEGRSUGHW-UHFFFAOYSA-N	Steroids and steroid derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS34	(3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((2R)-6,7-dihydroxy-6-methylheptan-2-yl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,7,12-triol	4.23		927.25		XZDXHPDYLPEFGI-FIMYPYCPFA-N	Steroids and steroid derivatives	Detected	Not detected
PSGNPS173	(6R)-2-(hydroxymethyl)-6-((3R,5R,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)heptanoic acid		4.70		955.28	WJAIFDIPOXPQB-AMPWAIWWSA-N	Steroids and steroid derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS191	Cholesterol		9.78		373.23	QYIXCDOBOSTCEI-UHFFFAOYSA-N	Steroids and steroid derivatives	Not detected	Detected
PSGNPS74	alpha-D-Glucopyranoside, beta-L-fructofuranosyl, 6-(4-hydroxy-3-methoxybenzoate)	6.05		515.12		CFTZBGSPBBNRN-GXFVINSESA-N	Tannins	Detected	Not detected

Chapitre 2 :

Les antioxydants lipophiles des grains de maïs (*Zea mays*) : leur composition selon les groupes hétérotiques et leur contribution à la sensibilité/résistance des maïs à *Fusarium graminearum*.

Chapitre 2 : Les antioxydants lipophiles des grains de maïs (*Zea mays*) : leur composition selon les groupes hétérotiques et leur contribution à la sensibilité/résistance des maïs à *Fusarium graminearum*.

Parmi les composantes de la résistance du maïs à *F. graminearum*, outre la résistance de type I qui se situe au niveau des soies, les autres niveaux de résistance s'appuient sur des caractéristiques physicochimiques des grains. Plusieurs études se sont intéressées à la contribution de différentes classes de métabolites secondaires aux mécanismes de résistance des maïs à *F. graminearum*. Ces études ont majoritairement ciblé les métabolites polaires et semi-polaires et ont souvent privilégié les phénylpropanoïdes. Compte tenu du faisceau d'arguments en faveur d'une implication de métabolites secondaires apolaires et en particulier de composés antioxydants lipophiles tel que décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, les caroténoïdes et tocochromanols ont été ciblés par notre étude. La composition en antioxydants lipophiles de grains matures issus de 33 génotypes de maïs appartenant à différents groupes hétérotiques a été caractérisée et les relations composition/sensibilité à GER et composition/résistance à GER étudiées. Il nous a semblé important de considérer les grains à maturité, avec l'idée que si de potentiels marqueurs biochimiques de résistance/sensibilité étaient identifiés par notre étude, leur utilisation dans les programmes de sélection ou comme outils de phénotypage serait facilitée, comparé à des métabolites présents uniquement dans des stades précoces (difficultés de collecte des échantillons et préservation de l'oxydation).

Ce chapitre est organisé autour de 3 études majeures : (1) Définition et optimisation des méthodes analytiques, (2) Composition des grains matures en caroténoïdes et tocochromanols selon les groupes hétérotiques, (3) Etude des relations composition en antioxydants lipophiles et degré de sensibilité/résistance des génotypes de maïs. Les deux derniers points ont été intégrés dans un projet d'article.

Chap.2 I) Optimisation des méthodes analytique pour l'étude des antioxydants lipophiles des maïs

Des tests préliminaires de mise au point des méthodes d'extractions et d'analyse des tocochromanols et des caroténoïdes ont été réalisés sur un panel de 33 lignées parentales cultivées dans différents lieux avec différentes origines (France, Allemagne et Etats Unis) et récoltés sur différentes années (2014 à 2019). La première étape d'optimisation a été de définir la quantité de grains à broyer et la méthode de broyage afin de limiter au maximum l'augmentation de température pour protéger la dégradation des antioxydants lipophiles. Cette étape a conduit au protocole suivant :

pour l'ensemble des expérimentations sur grains, 20 g sont broyés à l'aide d'un broyeur de type centrifuge Retsch ZM 200 et une durée de 2 minutes.

Pour l'extraction des tocochromanols, nous avons testé les méthodes utilisées par Picot *et al.* (Picot *et al.* 2013) et Lux *et al.* (Lux *et al.* 2020). Comme indiqué sur la Figure 1, la méthode de Lux *et al.* en rouge permet l'extraction de huit tocochromanols dont quatre tocotrienols (α -, β -, γ - et δ -) et quatre tocophérols (α -, β -, γ - et δ). La méthode de Picot *et al.* en bleu permet l'extraction de 7 tocochromanols dont trois tocotrienols (α -, β -, et γ et quatre tocophérols (α -, β -, γ - et δ). Concernant les résultats quantitatifs, les concentrations de tous les tocochromanols ont été beaucoup plus importantes avec la méthode de Lux *et al.* sauf pour le α -tocotrienol. En conséquence, nous avons sélectionné la méthode de Lux *et al.* pour la suite de nos études.

La méthode HPLC/FLD utilisée pour les tocochromanols est la même que celle décrite dans l'étude de Lux *et al.*

Pour les caroténoïdes nous avons testé les méthodes utilisées par Kurilich et Juvik (Kurilich & Juvik 1999), Picot *et al.* (Picot *et al.* 2013) et Lux *et al.* (Lux *et al.* 2020) (Figure 2). Nous avons sélectionné la méthode de Picot *et al.* qui nous permet de prendre en compte un nombre plus important de caroténoïdes dont le β -carotène (pic élué à 35 minutes - non représenté sur la Figure 2). Le β -carotène n'était pas observable avec les autres méthodes. La méthode de Picot *et al.* conduit aussi à des rendements d'extraction supérieurs, la surface des pics est nettement plus importante, comparé à celles obtenues avec les deux autres méthodes et ceci pour l'ensemble des caroténoïdes : la surface du pic correspondant à la lutéine est 300 % supérieure par rapport à celui obtenu avec la méthode de Lux, celle associée au pic de zéaxanthine est 150 % supérieure comparée aux deux autres méthodes, la surface associée au pic de β -cryptoxanthine est 25 % supérieure par rapport à la méthode de Lux. La méthode HPLC/DAD utilisée pour les caroténoïdes a été optimisée : colonne Develosil RPAQUEOUS (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) et élution isocratique avec un mélange de solvants acétonitrile/chloroforme (70/30, v/v) et un débit de 1 mL.min⁻¹.

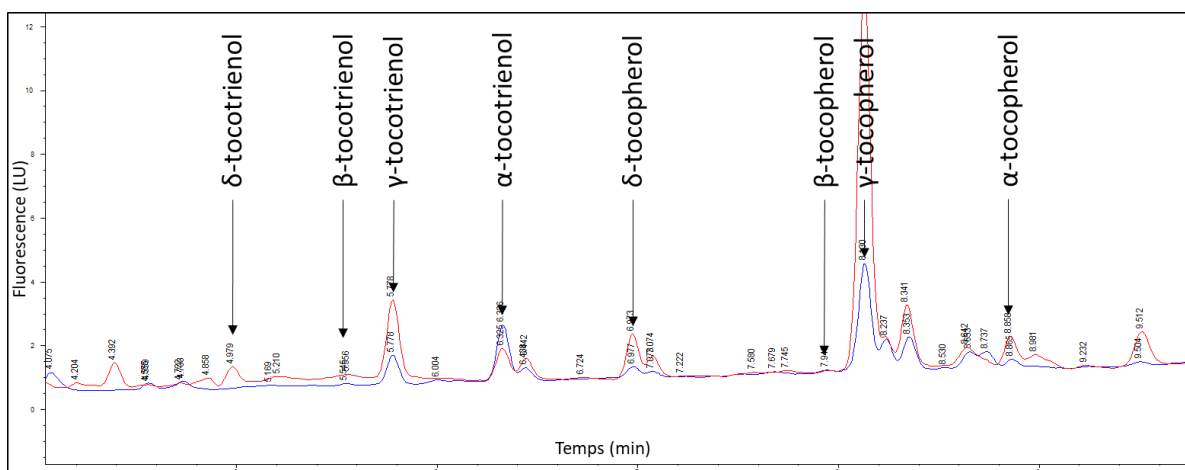


Figure 1. Comparatif des méthodes d'extraction des tocochromanols. La ligne rouge représente le chromatogramme (excitation 290 nm, émission 330 nm) de la méthode de Lux *et al.* et la ligne bleue représente le chromatogramme (excitation 290 nm, émission 330 nm) de la méthode de Picot *et al.*

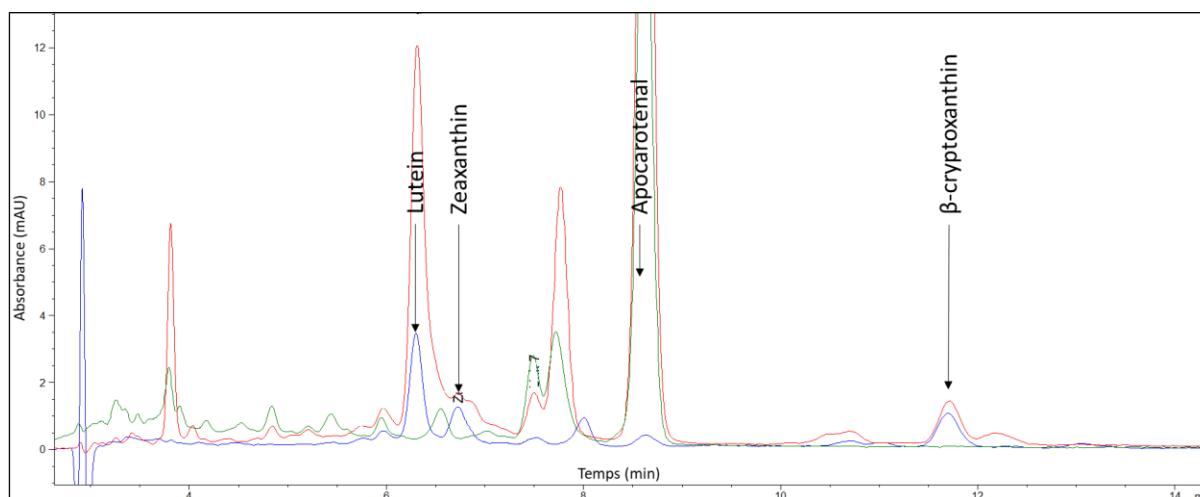


Figure 2. Comparatif des méthodes d'extraction des caroténoïdes. La ligne bleue représente le chromatogramme extrait à 450 nm de la méthode de Lux *et al.*, la ligne rouge représente le chromatogramme extrait à 450 nm de la méthode de Picot *et al.* et la ligne verte représente la méthode de Kurilich and Juvik. Apocarotenal a été utilisé comme étalon interne.

Chap.2 II) Lipophilic antioxidant occurring in mature maize kernels: influence of the maize genetic origin on their composition and their involvement in resistance to *Fusarium graminearum*. (Article en préparation)

Savignac Jean-Marie, Atanasova Vessela, Chereau Sylvain, Gallegos Nathalie, Richard-Forget Florence

A- Introduction

Maize is the most important crop produced around the world with a production superior to 1,100 billion tons in 2020 (<http://faostat.fao.org>). This production is constantly growing since several decades (Erenstein *et al.* 2022). Maize is an important agricultural commodity used for animal feed, human food and different sectors of industry, notably starch industry. Wholegrain kernels are acknowledged as a rich source of carbohydrates and fibers, with moderate amounts of total proteins (Nuss & Tanumihardjo 2010). In addition, maize is an essential source of various major phytochemicals including carotenoids, phenolic compounds, and phytosterols (Gálvez Ranilla 2020). It also contains various vitamins including vitamin C, vitamin E (tocopherol), vitamin K, vitamin B1 (thiamine), vitamin B2 (niacin), vitamin B3 (riboflavin), vitamin B5 (pantothenic acid), vitamin B6 (pyridoxine) (Rouf Shah *et al.* 2016). In addition to their nutritional values, the antioxidant metabolites occurring in maize belong to the chemical arsenal that the plant can use to combat various bioaggressors and notably fungal pathogens (Gauthier *et al.* 2015). Most of the knowledge related to the role of maize antioxidant metabolites has however focused on phenylpropanoids (Gauthier *et al.* 2015; Atanasova-Penichon *et al.* 2016) and very few is known regarding the potential involvement of lipophilic antioxidants that mainly include carotenoids and tocochromanols. And yet, these metabolites are naturally abundant in maize kernels, their level and composition depending on the genotype and the agroclimatic characteristics of the production area (Kurilich & Juvik 1999; Ortiz-Monasterio *et al.* 2007; Chander *et al.* 2008; Berardo *et al.* 2009; Picot *et al.* 2013; Xie *et al.* 2017; Sun *et al.* 2022). Actually, maize is one of the cereal crops that contain the highest amounts of carotenoids (Trono 2019) and tocochromanols (Savignac *et al.* 2022).

Among the various fungal pathogens that can attack maize crop, *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Gibberella* ear rot (GER), is acknowledged as one of the major threats worldwide (Ferrigo *et al.* 2016). In addition to significantly impact the crop yield, this fungus is able to produce a family of mycotoxins named type trichothecenes (TCTB) which are harmful to human and animal health (Pestka 2010; Sobrova *et al.* 2010). Minimizing the damage induced by *F. graminearum* including its mycotoxin production is a key pillar to improve food security and safety associated with maize production. Among the agronomic practices recommended to combat *F. graminearum*, breeding and growing resistant genotypes is one of the most efficient and sustainable strategies (Leslie *et al.* 2021). During the past

decade, increasing efforts have been undertaken to identify genetic sources for maize resistance to GER and numerous QTLs have been identified (Akohoue & Miedaner 2022). While significant progress has been achieved, the success of selection for GER resistance remains however still challenging. Combined with genetic approaches, biochemical ones hold great potential to improve the understanding on the molecular mechanisms controlling *F. graminearum* and GER, this knowledge being a key requirement to improve maize resistance.

The present study aims to investigate the potential contribution of maize lipophilic antioxidants to the chemical defense employed by maize to counteract *F. graminearum*. Actually, very few studies have targeted these metabolites while there are strong arguments supporting their potential contribution to maize resistance to GER. To summarize, these arguments that are discussed in the review of Savignac *et al.* (Savignac *et al.* 2022) are: (i) their demonstrated involvement in resistance to abiotic stresses, abiotic stresses being important factors modulating the extent of symptoms induced by a fungal infection (Papendick 1974; Wildermuth & Morgan 2004), (ii) their antioxidant capacity and notably their ability to quench reactive oxygen species (ROS), (iii) their implication in the mediation of plant response signaling (Trono 2019), and (iv) their antifungal and anti-mycotoxin activity (Picot *et al.* 2013; Atanasova-Penichon *et al.* 2016). As a first step, the present study will explore the lipophilic antioxidant composition (tocochromanols and carotenoids) of mature maize kernels from a large set of genotypes belonging to different heterotic groups. In a second step, relationships between metabolomic data as regards tocochromanols and carotenoids and level of resistance to GER will be investigated.

B- Materials and methods

B.1- Plant material and field management

Plant material consists in 33 inbred lines provided by Syngenta® Seeds Company. The 33 inbred lines were grown in 2020 and 2021 in a field trial located at Garlin, in the southwest of France. Inbred lines were cultivated in two blocks, each block containing 20 plants of the 33 inbred lines. All plants were open pollinated. In 2020, three maize ears per block and per inbred line were collected at the maturity stage. In 2021, all ears of same genotype were pooled and three samples were taken. Kernels were immediately dried to 13% moisture content. Ears were then shelled, pooled by genotype, grinded (size <0.5 mm) with a centrifugal mill Retsch ZM 200 (Eragny, France) and stored at -20°C.

Plants are classified in four heterotic groups (Early IX/XI, European Northern Flint, Iodent and Stiff Stalk Synth) based on their genetic profile (Table 1). Their susceptibility to GER was assessed by Syngenta® by notations of symptoms severity based on artificial inoculation conditions and non-inoculated ones. Susceptibility notations were made using a Bolton-like scale (1-9 notations), based on observations repeated on several years (from 2008 to 2019) and in several environments (principally France with

Garlin, Les Pas and Saint Paul Les Romans and Deutschland with Wadersloh), and the average between notations (natural infection + artificial inoculation) was calculated for determining the final level of susceptibility. S1 notation represent tolerant lines (noted 1-2), S2 notation represent medium susceptible lines (noted 2-4) and S3 notations represent susceptible lines (noted >4).

Table 1. The 33 genotypes used in this study: their heterotic group and GER susceptibility level. GER susceptibility was assessed by visual phenotyping by Syngenta.

Genotypes	Heterotic groups	Average notation	Susceptibility	Average natural infection notation	Natural infection susceptibility	Average artificial inoculation notation	Artificial inoculation susceptibility
G1	Early IX/XI	6.7	S3	5.7	S3	7.6	S3
G2	Early IX/XI	4.2	S3	3.3	S2	4.4	S3
G3	Early IX/XI	5.6	S3	3.0	S2	6.4	S3
G4	Early IX/XI	5.8	S3	6.3	S3	5.2	S3
G5	Early IX/XI	2.7	S2	1.0	S1	3.8	S2
G6	European Northern Flint	3.3	S2	1.6	S1	4.0	S3
G7	European Northern Flint	2.3	S2	1.0	S1	2.6	S2
G8	European Northern Flint	1.5	S1	1.0	S1	1.6	S1
G9	European Northern Flint	1.5	S1	1.5	S1	1.5	S1
G10	Stiff Stalk Synth	3.2	S2	1.5	S1	3.5	S2
G11	Stiff Stalk Synth	5.9	S3	6.5	S3	5.8	S3
G12	European Northern Flint	1.3	S1	1.1	S1	1.4	S1
G13	Early IX/XI	1.3	S1	1.5	S1	1.2	S1
G14	Early IX/XI	2.8	S2	1.2	S1	3.3	S2
G15	Early IX/XI	6.4	S3	7.3	S3	5.8	S3
G16	Stiff Stalk Synth	4.2	S3	2.0	S2	4.6	S3
G17	Iodent	5.0	S3	5.3	S3	4.9	S3
G18	Iodent	2.4	S2	1.3	S1	2.9	S2
G19	Early IX/XI	3.7	S2	2.3	S2	4.3	S3
G20	Iodent	1.5	S1	1.5	S1	1.5	S1
G21	European Northern Flint	4.6	S3	1.3	S1	5.9	S3
G22	European Northern Flint	1.2	S1	1.0	S1	1.3	S1
G23	Early IX/XI	7.2	S3	5.8	S3	7.8	S3
G24	Early IX/XI	6.4	S3	1.8	S1	8.3	S3
G25	Early IX/XI	6.0	S3	1.0	S1	8.0	S3
G26	European Northern Flint	1.3	S1	1.3	S1	1.3	S1
G27	Iodent	5.7	S3	N/A	N/A	5.7	S3
G28	Iodent	1.4	S1	1.0	S1	1.5	S1
G29	Iodent	4.5	S3	2.5	S2	5.5	S3
G30	Iodent	3.3	S2	1.3	S1	4.5	S3
G31	Iodent	1.7	S1	1.0	S1	1.8	S1
G32	Early IX/XI	2.5	S2	1.1	S1	3.4	S2
G33	Early IX/XI	1.8	S1	1.1	S1	2.2	S2

B.2- Pure compounds and reagents

Standards of α -, β -, δ -, γ -tocopherol and tocotrienol, zeaxanthin, lutein, β -apo-8'-carotenal, β -cryptoxanthin and β -carotene were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Solvents (methanol (MeOH), acetonitrile, dichloromethane, chloroform) were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Reagents (butylated hydroxytoluene, acetic acid, potassium hydroxide, ascorbic acid) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain), Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), MP Biomedicals (Illkirch, France) and Thermo Fischer Scientific (Illkirch, France).

B.3- Tocochromanols extraction and quantification

The extraction and quantification procedures were adapted from Lux *et al.* (Lux *et al.* 2020). Tocochromanols were extracted from 100 mg of dried and grounded maize kernels by adding 1.8 mL of water, 1.2 mL of aqueous KOH (50%, w/v) and 4 mL of ethanol that contain 1% of ascorbic acid.

Samples were incubated in a water bath at 70°C for 30 minutes under stirring to saponify interfering lipids. After saponification, samples were immediately putted on ice. A mix of 50 µL of ethanol containing 1 mg.mL⁻¹ BHT, 2 mL of water, 1.2 mL of acetic acid and 4 mL of hexane was added. Samples were then vortexed for 30 s and centrifuged for 3 minutes at 4°C. Organic phase was collected and samples were extracted two times more with 4 mL of hexane. The organic layer was then evaporated to dryness under a nitrogen stream. All steps of extraction were realized with low luminosity. Dried samples were reconstituted in 300 µL of methanol, filtrated using 0.2 µm filters (acrodisc 13mm minispikes with 0.2 µm PTFE, Pall Corporation, Saint-Germain-en-Laye, France) and transferred in amber vials for analysis.

Tocochromanols were quantified by Liquid Chromatography coupled to fluorescence detector (LC/FLD) using an Agilent Technologies 1100 series system equipped with an auto sampler system, an Agilent FLD detector and the ChemStation chromatography manager software Rev. A.10.02 (Agilent, Les Ulis, France). Separation of compounds was achieved on a Kinetex 2.6 µm FS 100 Å LC column (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Le Pecq, France), maintained at 45°C. The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B) and the gradient elution was as follows: 85% B for 1 min, 85%-100% B in 14 min; 100% B for 5 min; 100%-85% B in 1 min; 85% B for 7 min. The flow rate was set at 1.2 mL.min⁻¹. An injection volume of 5 µL was used. The fluorescence detector was set at excitation 290 nm and emission 330 nm. Standards of α-, β-, δ-, γ-tocopherol and tocotrienol were dissolved in MeOH from 1 to 50 mg.L⁻¹. These standards were used as external calibration curves.

B.4- Carotenoid extraction and quantification

The extraction and quantification procedures were adapted from Picot *et al.* (Picot *et al.* 2013). Carotenoids were extracted from 600 mg of dried and grounded maize kernels by adding 3 mL of methanol that contained 0.1% of butylated hydroxytoluene (BHT, w/v), followed by vortexing for 20 s and shaking for 10 min at 50 rpm. Then, 1.8 mL of 12% (w/v) KOH were added to the supernatant in order to saponify potentially interfering lipids. Samples were vortexed for 30 s and agitated for 30 min. Following saponification, an internal standard, namely β-apo-8'-carotenal (50 µL, 100 µg.mL⁻¹), was added. Carotenoids were then extracted three times with hexane layers (1.8 mL) after centrifugation for 10 min at 3000g. The organic layer was then evaporated to dryness under a nitrogen stream. All steps of extraction were realized with low luminosity. Dried samples were reconstituted in 200 µL of methanol, filtrated using 0.2 µm filters (acrodisc 13mm minispikes with 0.2 µm PTFE, Pall Corporation, Saint-Germain-en-Laye, France) and transferred in amber vials for analysis. Carotenoids were quantified on an Agilent LC/DAD system as described above. Separation of compounds was achieved on a Develosil RPAQUEOUS column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Le Pecq, France), maintained at 30°C. The mobile phase consisted of acetonitrile/chloroform (80/20, v/v). Isocratic

elution was performed at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ for 40 min. The injection volume was 5 µL. The UV-visible spectra were recorded from 190 to 500 nm and peak areas were measured at 450 nm. Quantification was performed by external calibrations with standard solutions prepared from commercial pure powders. Standards of β-apo-8'-carotenal, β-cryptoxanthin were dissolved in methanol / acetonitrile (50/50, v/v) from 1 to 50 mg.L⁻¹ for β-apo-8'-carotenal and from 0.5 to 25 mg.L⁻¹ for β-cryptoxanthin. Standards of lutein, zeaxanthin and β-carotene were dissolved in methanol/acetonitrile/dichloromethane (25/25/50, v/v/v) from 3.25 to 50 mg.L⁻¹. These standards were used as external calibration curves.

B.5- Expression of results and statistical analyses

Principal component analysis (PCA) and statistical analyses were performed using R x64 4.1.4 and RStudio software v 1.3.1093 (Boston, USA). Results of lipophilic antioxidant concentrations were reported as mean values ± standard deviation. Normal distribution of the values was tested with Shapiro-Wilk tests. Kruskal-Wallis tests were carried out and statistics were realized with pairwise Wilcoxon test. MANOVA and ANOVA statistical analysis were realized using XLStat 2022.4.1 software. MANOVA significance was validated by Wilks test. Differences between samples were determinate with a multiple comparisons test using the Tukey and Newman-Keuls method. For all tests, the level of significance was set at $p \leq 0.05$.

C- Results

C.1 - Carotenoid and tocochromanol compositions of mature maize kernels

C.1.a Carotenoid content of maize kernels

The carotenoid composition of the 33 maize genotypes harvested in 2020 and 2021 was analyzed using LC/DAD. Three major peaks with UV-visible spectra exhibiting a maximum at 450 and 480 nm were unequivocally identified as lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin by comparison with retention times and absorption spectra of reference standards and quantified using their respective external calibration curves. One additional peak was ascribed to β-carotene but, for all genotypes, it was quantified at values close to the limit of quantification of the analytical method used (LOQ = 0.5 µg.g⁻¹). The minimum, maximum and average values of analyzed genotypes in 2020 and 2021 are presented in Table 2. Total carotenoid concentrations ranged between 2.94 and 15.56 µg.g⁻¹ of maize for 2020 and between 1.18 and 12.18 µg.g⁻¹ for 2021 and showed differences between genotypes (Supplementary Table 1). ANOVA analysis showed a year effect on carotenoids. Lutein was found as the compound reaching the highest amount, with concentrations ranging from traces (2021) and 0.91 (2020) to 9.06 µg.g⁻¹ dry matter (2020) and 9.47 µg.g⁻¹ dry matter (2021). Zeaxanthin was quantified

at values between 1.02 and 5.00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and traces and 3.65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2021. β -cryptoxanthin was the third most abundant carotenoid with amounts ranging from traces and 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in both years 2020 and 2021. Finally, β -carotene was present at the lowest amount with concentrations comprised between traces and 2.24 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of maize in 2020 and was not detectable in 2021 in any sample. The Figure 3A represents the medium percentage of each carotenoid for all genotypes and the two years of observation. Lutein, the major carotenoid, accounts for more than half of the total carotenoids, followed by zeaxanthin and β -cryptoxanthin, which account for 35% and 14% of the total, respectively. The β -carotene is present only in traces and represents less than 1% of the total carotenoids.

Table 2. Concentrations in carotenoids and tocochromanols in mature maize kernels harvested in 2020 and 2021. In blue are presented the composition of genotypes harvested in 2020, in green the composition of genotypes harvested in 2021. Average were calculated by means of all samples from the 33 genotypes for each year of observation. All results are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry maize kernels. <LOQ means below the limit of quantification.

2020/2021	Min ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Max ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Average ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Lutein	0.91/<LOQ	9.06/9.47	3.85/3.4
Zeaxanthin	1.02/<LOQ	5.00/3.65	2.95/1.88
β -cryptoxanthin	<LOQ/<LOQ	3.45/3.08	1.16/0.73
β -carotene	<LOQ/<LOQ	2.24/<LOQ	0.03/<LOQ
Total carotenoid	2.94/1.18	15.56/12.18	7.99/6.01
α -tocopherol	<LOQ/<LOQ	30.50/15.62	10.42/1.78
β -tocopherol	<LOQ/<LOQ	4.04/0.57	1.19/0.05
γ -tocopherol	4.39/0.82	66.54/42.25	23.67/14.16
δ -tocopherol	<LOQ/0.06	5.30/2.10	2.34/0.97
Total tocopherol	7.90/1.38	84.90/59.15	37.62/16.96
α -tocotrienol	<LOQ/<LOQ	19.43/7.86	7.84/1.54
β -tocotrienol	<LOQ/<LOQ	3.70/0.50	1.69/0.08
γ -tocotrienol	<LOQ/0.17	11.95/10.18	4.04/2.29
δ -tocotrienol	<LOQ/<LOQ	1.94/0.75	1.01/0.30
Total tocotrienol	1.92/1.07	29.44/13.55	14.58/4.21
Total tocochromanols	10.94/3.76	107.19/70.68	52.20/21.17

C.1.b Tocochromanol content of maize kernels

Tocochromanol composition of the 33 maize genotypes harvested in 2020 and 2021 was analyzed using LC/FLD. Eight peaks were unequivocally identified corresponding to the four isomers of tocotrienols (α -, β -, γ - and δ -) and the four isomers of tocopherols (α -, β -, γ - and δ -) with comparison

to retention times and absorption spectra of reference standards. Difference between isomers is based on the position of methyl groups on the chromanol ring. All peaks were identified and quantified using fluorescence with excitation at 290 nm and detection at 330 nm.

The total tocochromanol content ranged between 10.94 and 107.19 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dried maize for the year 2020 and 3.76 and 70.68 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2021 (Table 2). Tocopherols were the most abundant with concentrations ranging from 7.90 and 84.90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and 1.38 to 59.15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2021 while tocotrienols were quantified in concentrations ranging from 1.92 and 29.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and from 1.07 to 13.55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2021. The ANOVA analysis showed a year effect on tocochromanol composition. Among the tocopherols, the γ - and α - forms were observed as the most present in maize kernels with concentration reaching up to 64.54 and 30.50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively in 2020 and 42.25 and 15.62 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively in 2021, while β - and δ - forms were present in traces with less than 6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and less than 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2021. Similar observations were made for tocotrienols. The γ -tocotrienol, which was the most abundant tocotrienol was quantified in concentrations ranging between values lower than the LOQ and 11.95 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and 10.18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of maize in 2021. The α -tocotrienol was characterized by levels comprised between values lower than the LOQ and 19.43 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and 7.86 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2021, while the two last forms of tocotrienols were present in very low quantity, inferior to the LOQ. The details of average tocochromanols in each genotype can be found in Supplementary Tables 2 and 3. As evidenced in Figure 1, tocopherols were found to represent a large majority of total tocochromanols (close to 75% of the total). The γ -tocopherol was largely present in mature maize kernels and accounted for more than 50% of the total tocochromanols, followed by α -tocopherol (16.6%), α -tocotrienol (12.8%) and γ -tocopherol (8.6%). The remaining tocochromanols were present in traces and accounted for 10% of the total tocochromanols.

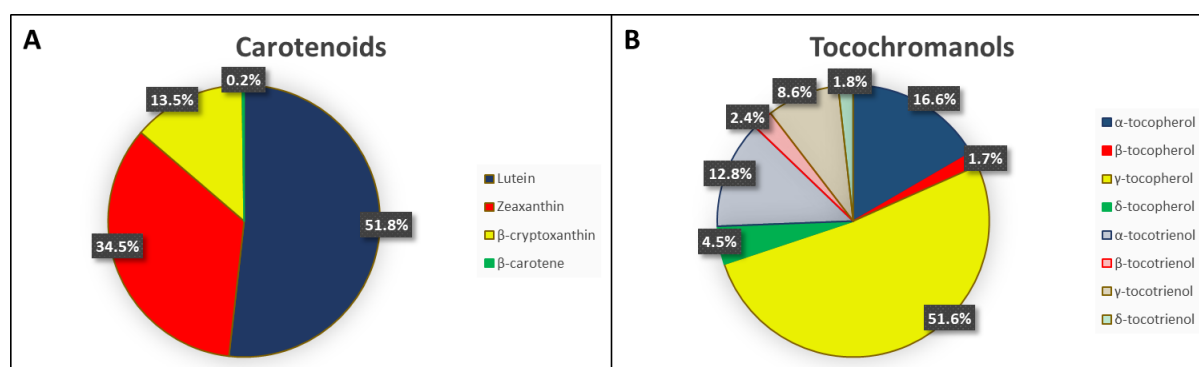


Figure 1. A: Mean carotenoid percentages in mature maize kernels harvested in 2020 and 2021. B: Mean tocochromanol percentages in mature maize kernels harvested in 2020 and 2021.

C.2 – Is the lipophilic antioxidant composition is different according to the heterotic group?

In order to evaluate whether the carotenoid composition was different according to the maize genetic group, principal-component analyses (PCA) were performed. The PCA biplot reported in Figure 4 shows the distribution of genotypes in the plane defined by the first two components, which explained 90 and 93% of the total variance for 2020 and 2021, respectively. The PCA biplot also allows to assess how strongly each carotenoid variable can influence the genotype separation. On Figure 2, it clearly appears that carotenoid data allow the discrimination of heterotic groups for the two years of observations suggesting a possible link between the genetic origin of the genotype and its carotenoid content. On Figure 2A, we can observe that the Stiff Stalk Synth, European Northern Flint and Iodent groups are close to each other. These three groups are characterized by high levels of total carotenoids and lutein, these variables contributing positively to the Dim1 and Dim2 axis. The Early IX/XI group seems separated from the other groups and contains higher levels of zeaxanthin and β -cryptoxanthin. These two carotenoids contribute positively to the Dim1 and negatively to the Dim2 axis. The same observations can be made on Figure 2B for the 2021 samples.

ANOVA was then used to evaluate any significant separation of the heterotic groups according to their carotenoid concentrations. The most discriminating data were obtained for lutein and β -cryptoxanthin; the corresponding boxplots are reported in Figure 3. The boxplots for zeaxanthin and total carotenoids are reported in Supplementary Figure S1. Concerning lutein levels in samples harvested in 2020, results showed that European Northern Flint and Iodent groups contained similar concentration; around 4.5 $\mu\text{g/g}$. Stiff Stalk Synth group was the richest in lutein with mean concentration of 6 $\mu\text{g/g}$. On the contrary, the Early IX/XI group was significantly different from the three others with lowest lutein levels (3 $\mu\text{g/g}$). Concerning β -cryptoxanthin, only the European Northern Flint group was significantly different from the others, with a mean concentration of 0.8 $\mu\text{g.g}^{-1}$ while the three other groups were characterized by β -cryptoxanthin concentrations close to 1.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$. In 2021 samples, same tendencies were observed.

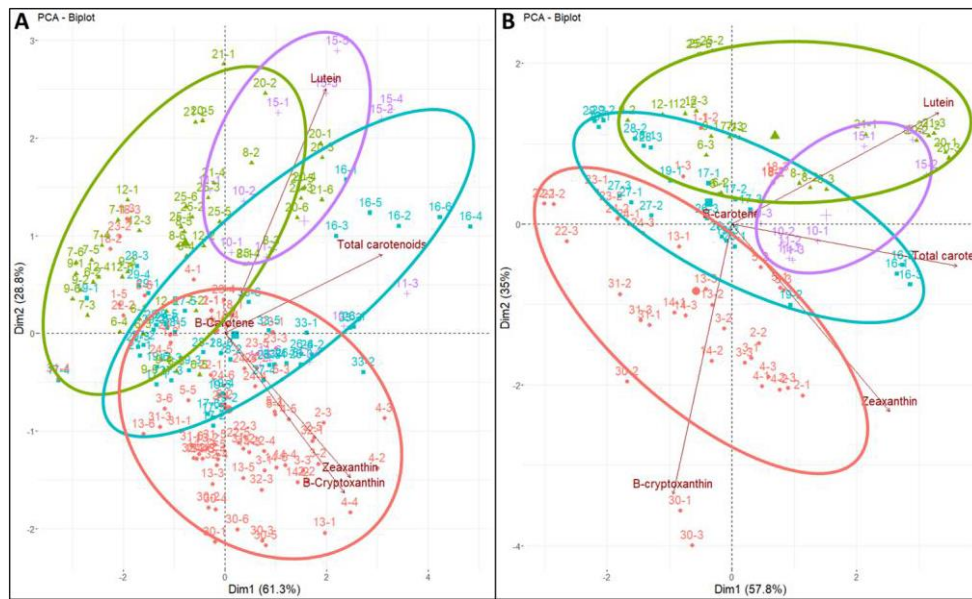


Figure 2. Principal component analysis merging score and loading plots for carotenoids in maize kernels of 33 inbred lines colored by heterotic groups. A: Biplot made with observations of the 2020 harvest with 185 individuals and 5 variables. B: Biplot made with the observations of 2021 harvest with 91 individuals and 5 variables. Red plots correspond to Early IX/XI heterotic group, green plots to European Northern Flint heterotic group, blue plots to Iodent heterotic group and purple to Stiff Stalk Synth heterotic group.

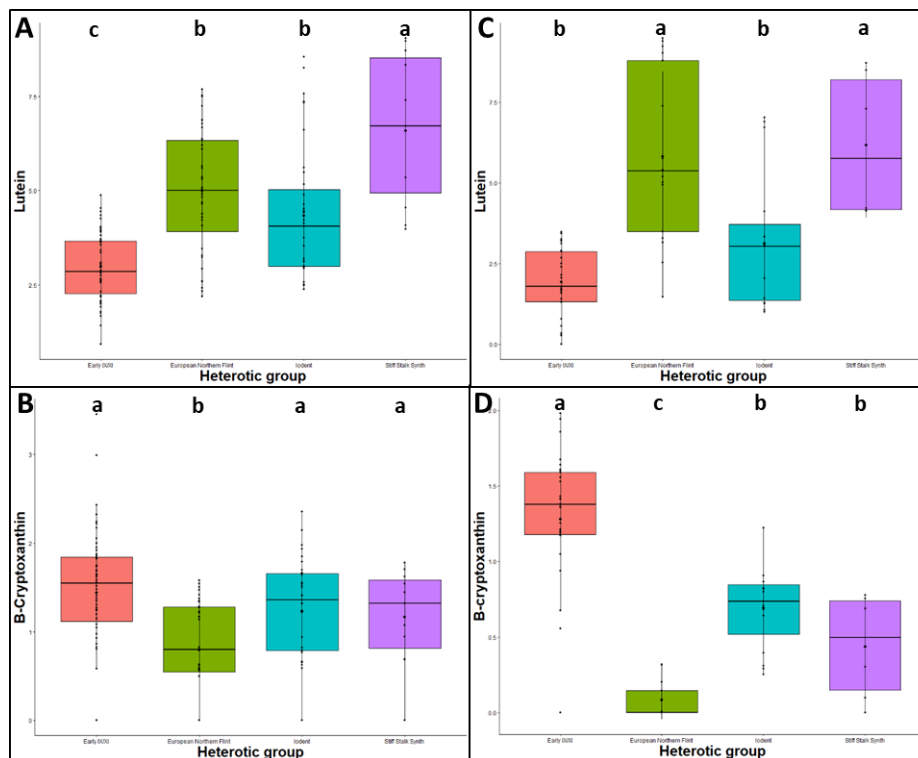


Figure 3. Boxplots of lutein and β -cryptoxanthin concentrations in the different heterotic groups. A: Lutein concentrations in 2020 samples. B: β -cryptoxanthin concentrations in 2020 samples. C: Lutein concentrations in 2021 samples. D: β -cryptoxanthin concentrations in 2021 samples. Red plots correspond to Early IX/XI heterotic group, green plots to European Northern Flint heterotic group, blue plots to Iodent heterotic group and purple to Stiff Stalk Synth heterotic group. Statistical analysis and grouping were realized using Newman-Keuls method. Values are expressed in μg of carotenoid per g of maize kernel.

Regarding tocochromanols, the PCA biplot reported in Figure 4 shows the distribution of genotypes in the plane defined by the first two components, which explained 71 and 66% of the total variance for 2020 and 2021, respectively. This representation also allows evidencing which tocochromanol may contribute to the observed separation. Data gathered in Figure 4A and 4B clearly indicate the discrimination of the Stiff Stalk Synth heterotic group from the three other groups and the two years of harvest. The Stiff Stalk Synth group was characterized by high levels of β -tocotrienol, β -tocopherol and δ -tocotrienol in 2020, which contributed negatively to the Dim2 axis. In 2021, this heterotic group was characterized by medium levels of β -tocotrienol, β -tocopherol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol, which contributed to the Dim2 axis and by a low quantity of α -tocopherol and α -tocotrienol, which contributed positively to the Dim1 axis. In 2021 (Figure 6B), the European Northern Flint group was also distant from the three other groups. High levels of δ -tocotrienol, γ -tocotrienol and total tocotrienol, which contributed negatively to the Dim2 axis, could be responsible of this separation.

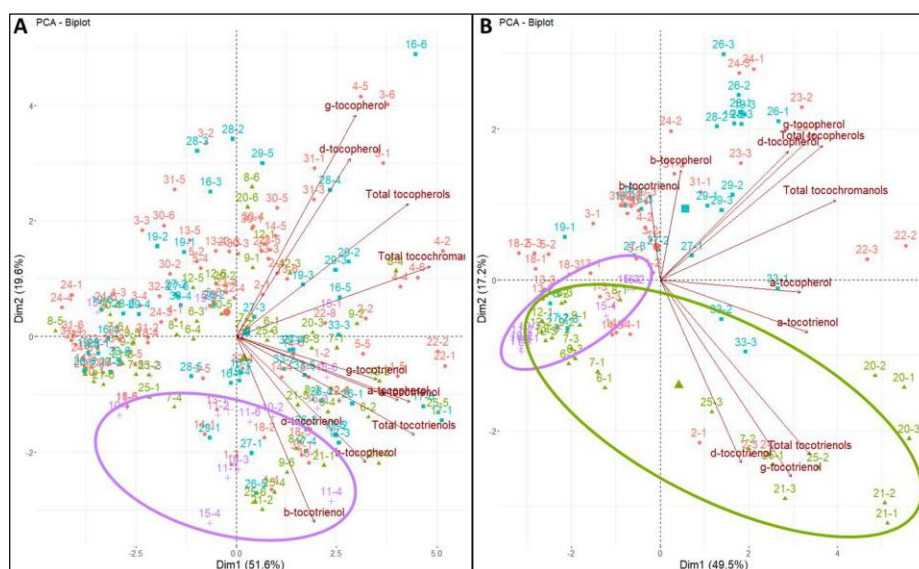


Figure 4. Principal component analysis merging score and loading plots for tocochromanols in maize kernels of 33 inbred lines colored by heterotic groups. A: Biplot made with observations of 2020 harvest with 189 individuals and 11 variables. B: Biplot made with observations of 2021 harvest with 95 individuals and 11 variables. Red plots correspond to Early IX/XI heterotic group, green plots to European Northern Flint heterotic group, blue plots to Iodent heterotic group and purple to Stiff Stalk Synth heterotic group.

ANOVA was then used to evaluate any significant separation of heterotic groups according to their tocochromanol concentrations. Most interesting results were obtained for γ -tocopherol, α -tocopherol, δ -tocopherol concentrations and the associated boxplots are reported in Figure 5. The boxplots related to the other tocochromanols can be found in Supplementary Figure S2. Concerning γ -tocopherol levels in 2020 and 2021 samples, the statistical analysis of our data indicated that the Stiff Stalk Synth group was characterized by the lowest concentrations (close to $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in 2020 and 5

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ In 2021). The previous heterotic group showed also the highest levels in α -tocopherol (close to $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) but such a difference was only observed for the 2020 samples. Genotypes from the Stiff Stalk Synth group were also discriminated from the three other heterotic groups for their δ -tocopherol concentrations. Whatever the considered year of harvest, they were characterized by the lowest concentrations. Finally, no differences between the heterotic groups were evidenced when considering the total tocochromanols in 2020; in 2021, the Stiff Stalk Synth group, apparently the less rich in tocochromanols, was differentiated from the others.

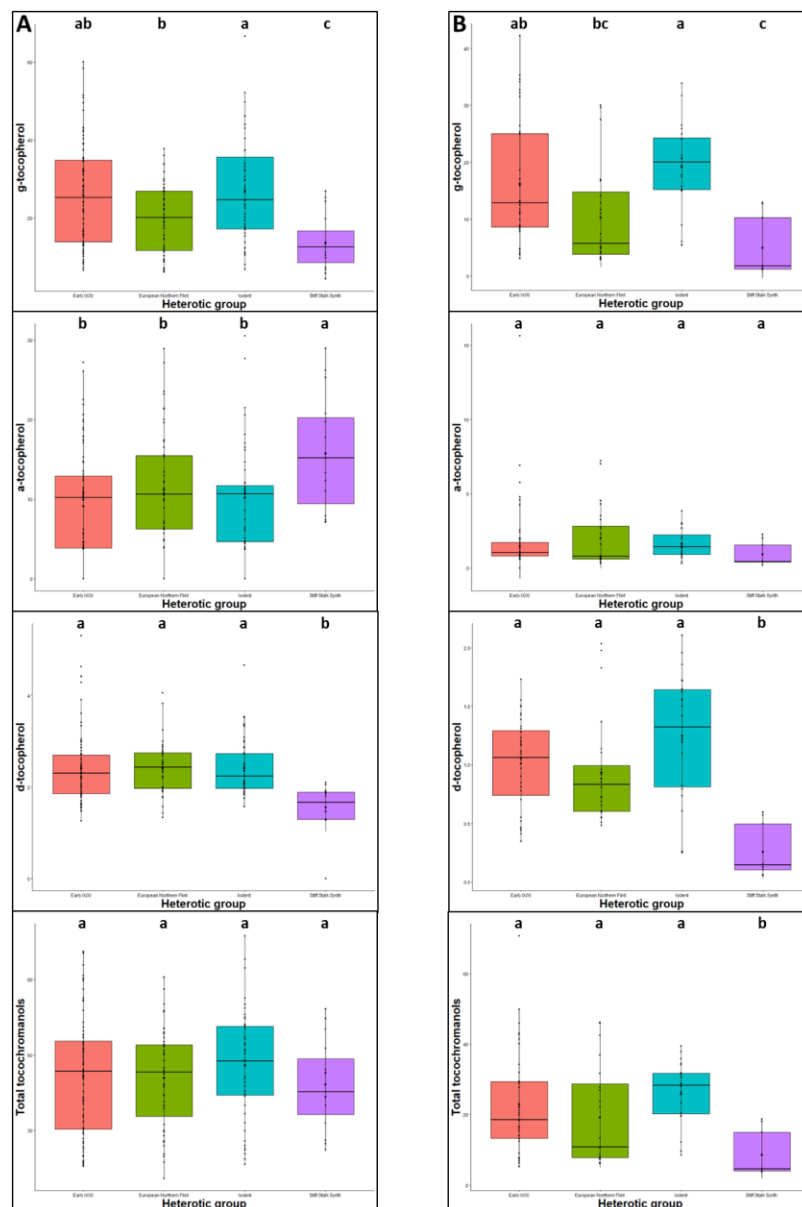


Figure 5. Boxplots of tocochromanols concentrations in heterotic groups. A: γ -tocopherol, α -tocopherol, δ -tocopherol and total tocochromanols concentrations in 2020 samples. B: γ -tocopherol, α -tocopherol, δ -tocopherol and total tocochromanols concentrations in 2021 samples. Red plots correspond to Early IX/XI heterotic group, green plots to European Northern Flint heterotic group, blue plots to Iodent heterotic group and purple to Stiff Stalk Synth heterotic group. Statistical analysis were performed by ANOVA and grouping were realized using Newman-Keuls method. Values are expressed in μg of tocochromanols per g of maize kernel.

Altogether, our data indicate that the maize heterotic groups can be discriminated according to their composition in lipophilic antioxidant metabolites. The main significant differences are reported in Table 3.

Table 3. Most significant differences in antioxidant lipophilic composition between the heterotic groups.

Heterotic group	Lutein		β -cryptoxanthin		γ -tocopherol		δ -tocopherol	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Early IX/XI	--	-	+	++	+	+	+	+
European Northern Flint	+	+	-	--	-	-	+	+
Iodent	-	-	-	-	++	++	+	+
Stiff Stalk Synth heterotic group	++	+	-	-	--	--	--	--

-- : very low quantity compared to other heterotic group. - : low quantity compared to other heterotic group. + : high quantity compared to other heterotic group. ++ : very high quantity compared to other heterotic group.

C.3 – Is the lipophilic antioxidant composition is different according to the genotype susceptibility to GER ?

In order to investigate potential relationships between carotenoid and tocopherol compositions and maize susceptibility to GER, PCA were performed for both susceptible and tolerant groups (S1 and S3 in table 1) of genotypes harvested in 2020 and in 2021 (Figure 6A,B and Figure 8A,B).

Concerning carotenoids, the PCA biplots show the distribution of genotypes in the plane defined by the first two components, which explained 90 and 95% of the total variance for 2020 and 2021, respectively (Figure 6A,B). The comparison of the PCA biplots show which carotenoids may contribute to the separation observed between susceptible and tolerant groups of genotypes (Figure 6 A,B). Our results showed a tendency but no clear differentiation between the two different groups for the two years of observations. Our data suggest that susceptible genotypes could be characterized by high levels of all carotenoids with exception of β -carotene.

Pairwise Wilcoxon tests analyses were performed to evaluate any significant separation of susceptible and tolerant groups of genotypes according to their carotenoid concentrations (Figure 7). As showed on boxplots gathering 2020 data, susceptible genotypes are richer in all carotenoids (zeaxanthin with a mean of 2.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in tolerant and 3.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in susceptible, β -cryptoxanthin with a mean of 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in tolerant and 1.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in susceptible, and a mean of total carotenoids of 6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in tolerant genotypes and 9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in susceptible) with p-values <0.01 for all compounds. However, this difference is not significant concerning lutein (p-value = 0.7). Concerning genotypes harvested in 2021, the same significant differences were observed for zeaxanthin (1.9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in tolerant genotypes and 2.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in susceptible) and β -cryptoxanthin (0.3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in tolerant and 1.3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in susceptible genotypes) suggesting that these two antioxidants could be linked to the maize kernel susceptibility to GER. These

results corroborate those highlighted by PCA analyses and have been confirmed by ANOVA tests, which indicate p-values <0.0001 for zeaxanthin, β -cryptoxanthin and the sum of carotenoids in 2020 and of 0.026 and 0.002 for zeaxanthin and β -cryptoxanthin in 2021n respectively. For the two years of observation, the differences in lutein concentrations according to the genotype susceptibility were not significant. This lack of significance was also observed for the sum of carotenoids in 2021 samples.

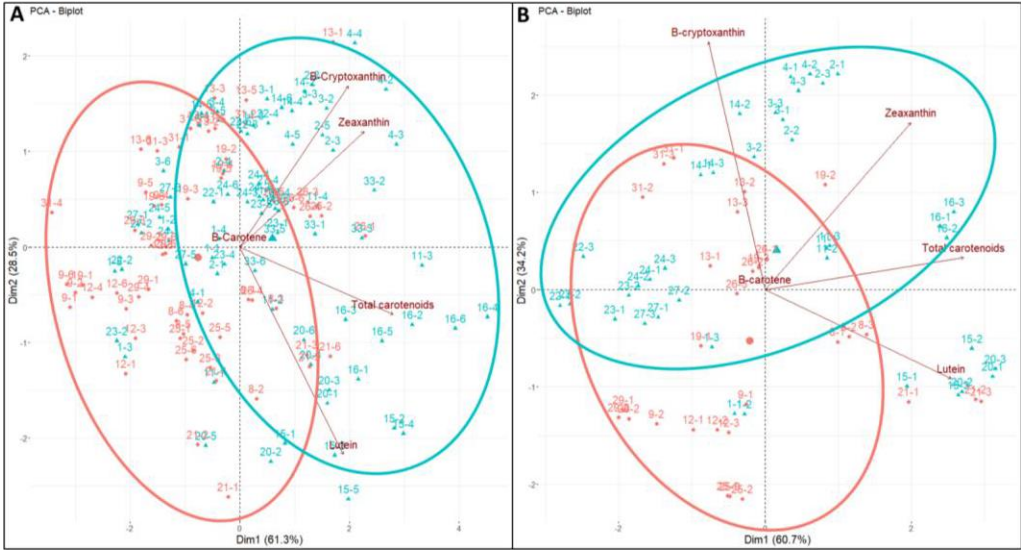


Figure 6. Principal component analysis merging score and loading plots for carotenoids in maize kernels of S1 and S3 inbred lines colored by susceptibility level. A: Biplot made with observations of 2020 harvest with 137 individuals and 5 variables. B: Biplot made with observations of 2021 harvest with 67 individuals and 5 variables. Red plots correspond to tolerant genotypes and blue plots correspond to susceptible genotypes.

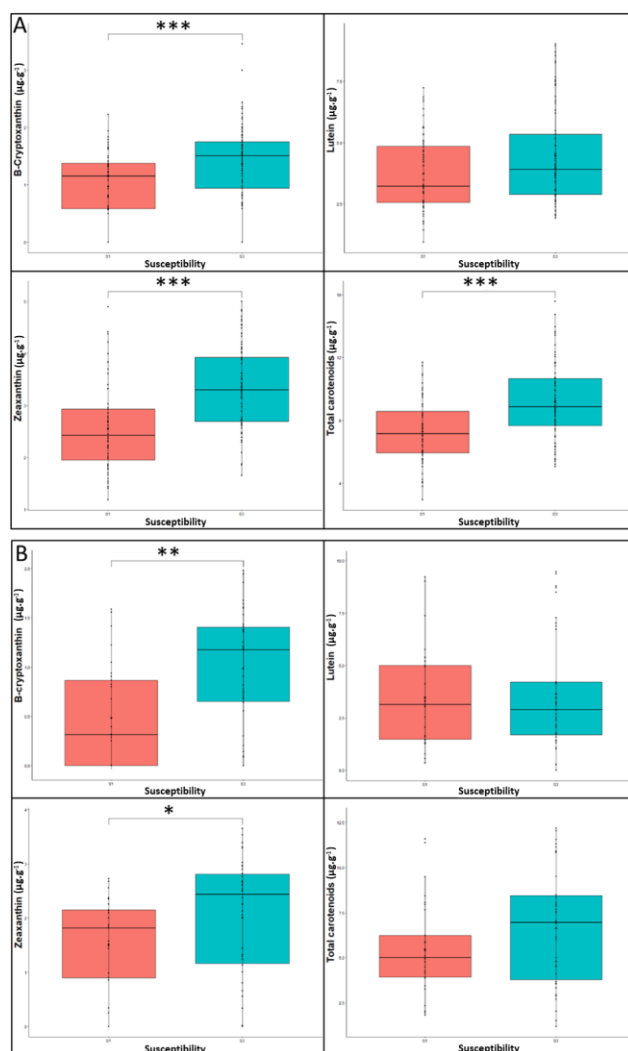


Figure 7. Boxplots of individual carotenoids for the two years of harvest of S1 and S3 genotypes. A: Boxplots made with observation of 2020 harvest. B: Boxplots made with observations of 2021 harvest. Red boxplots correspond to tolerant genotypes and blue boxplots correspond to susceptible genotypes. Stars * ($p = 0.05$), ** ($p = 0.01$) and *** ($p < 0.01$) indicate significant differences (pairwise Wilcoxon test). Values are expressed in μg of carotenoid per g of maize kernel.

If we consider the tocopherol compositions, the PCA representations gathering the 2020 and 2021 data are reported in Figures 8 A and B. These representations show the distribution of the genotypes in the plane defined by the two first components, which explained 71 and 66% of the total of variance for 2020 and 2021, respectively. It clearly appears that there is no clear clustering between the tolerant and susceptible groups of genotypes for the two analyzed years. Tocopherol composition does not allow discriminating the maize genotypes according to their level of susceptibility to GER. This lack of differences was further supported by Pairwise Wilcoxon tests (Figure 9). The boxplots reported in Figure 9, for both 2020 and 2021 samples, show that total tocotrienols, tocopherols and tocopherols values were not statistically different between tolerant and

susceptible genotypes. In addition, when considering each individual tocochromanol (Supplementary Figure S3), similar conclusions can be raised.

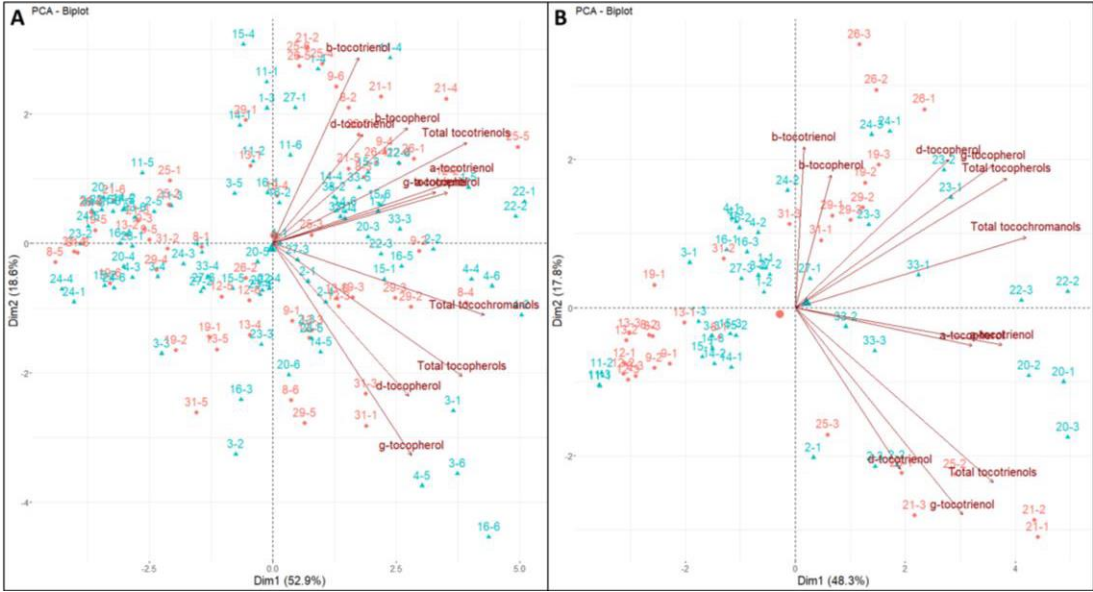


Figure 8. Principal component analysis merging score and loading plots for tocochromanols in maize kernels of S1 and S3 inbred lines colored by level of GER susceptibility. A: PCA made with observation of 2020 harvest with 141 individuals and 11 variables. B: PCA made with observations of 2021 harvest with 71 individuals and 11 variables. Red plots correspond to tolerant genotypes and blue plots correspond to susceptible genotypes.

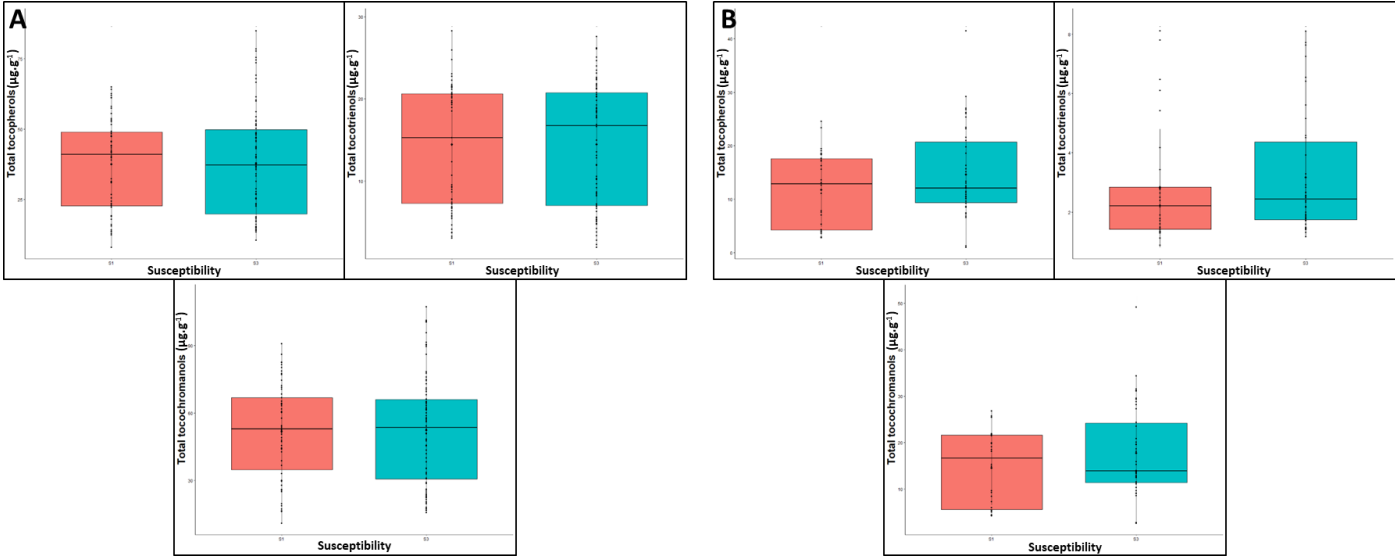


Figure 9. Boxplots of tocochromanols for the two years of harvest of S1 and S3 genotypes. A: Boxplots of total tocopherols, total tocotrienols and total tocochromanols made with observations of 2020 harvest. B: Boxplots of total tocopherols, total tocotrienols and total tocochromanols made with observations of 2021 harvest. Red boxplots correspond to tolerant genotypes and blue boxplots correspond to susceptible genotypes. Values are expressed in μg of tocochromanols per g of maize kernel. Statistical analysis was made using pairwise Wilcoxon test and shows no differences between susceptibility and tolerance.

D- Discussion

The aim of this study was to provide a comprehensive view of the lipophilic antioxidant content, more specifically tocopherols and carotenoids, occurring in maize kernels belonging to different genetic groups and to investigate the potential relationships between the metabolomic data and the level of susceptibility to GER of the studied genotypes. Actually, whereas the role of these compounds to plant protection to various biotic stresses has been widely investigated, very few has been published regarding their potential involvement in plant defense against bioaggressors and notably fungal pathogens. As detailed in the review of Savignac *et al.* (Savignac *et al.* 2022), there is a large body of arguments that support the potential contribution of these compounds to the mechanisms employed by plants to counteract toxigenic fungi and led us to believe that tocopherols and carotenoids as plant defense weapons have not received the attention they deserve.

Using a set of 33 genotypes belonging to four heterotic groups, our study has provided a clear picture of the qualitative and quantitative contents in tocopherols and carotenoids occurring in maize kernels grown in the southwest of France. Tocopherols were evidenced as major lipophilic antioxidant compounds, with maximal concentrations reaching up to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter. Carotenoids were present in far less levels with maximal concentrations close to 15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Similar ratios of abundance have been reported by Cabrero-Soto *et al.* (Cabrera-Soto *et al.* 2018) in a study targeting 23 hybrids grown in Mexico. Our data were however slightly different from those reported by Lux *et al.* (Lux *et al.* 2020) who described similar concentrations of carotenoids and tocopherols (close to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in kernels of maize cultivated in Germany; this study was however focusing on only one variety. Within tocopherols, tocopherols were quantified in higher amounts than tocotrienols, representing more than 70% of the total for the two years of observation. The major forms of both tocopherols and tocotrienols were the α - and γ - forms, the sum of which accounting for more than 85% of the total tocopherols and tocotrienols. This distribution is consistent with previously reported data that have addressed the tocopherol composition of maize kernels from different hybrids grown in different areas of the world (Kurilich & Juvik 1999; Xie *et al.* 2017; Sun *et al.* 2022). For a review of the most recently published data on tocopherols in maize, we encourage the reader to have a look at the publication of Savignac *et al.* (Savignac *et al.* 2022). Regarding the composition in carotenoids, lutein was evidenced as the most abundant compound followed by zeaxanthin and β -cryptoxanthin, while β -carotene was quantified in very low concentrations, lower than 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The observed richness in lutein of maize kernels corroborates previous data (Kurilich & Juvik 1999; Panfili

et al. 2004; Scott & Eldridge 2005; Trono 2019; Saenz *et al.* 2021). However, for some genotypes, zeaxanthin and not lutein has been described as the predominant compound (Calugar *et al.* 2022).

The present study was based on samples collected in a same location during two years, 2021 and 2022. The year 2020 was very warm and dry with many heat waves and high rainfall along the growing season while 2021 was a year characterized with less abiotic stressful conditions. Such climatic differences could be responsible for the lower concentrations in carotenoids and tocopherols observed in samples collected in 2021 compared to 2020. According to our data, the year-to-year variation appeared as more pronounced for tocopherols than for carotenoids. The impact of climatic conditions on plant carotenoid compositions has been widely investigated. For instance, studies addressing the carotenoid content of grass and wheat have clearly demonstrated the increase in their concentrations induced by abiotic stresses, this increase being associated with an up-regulation of the expression of biosynthetic genes (Aswath *et al.* 2005; De Santis *et al.* 2021). Actually, carotenoids have been acknowledged as playing a key role in plant protection against abiotic stress, notably as a result of their antioxidant capacity and their involvement in abscisic acid (ABA) biosynthesis (Yang *et al.* 2022). As carotenoids, tocopherols are highly related to stress tolerance, and their synthesis is part of the plant response to environmental stresses (Munné-Bosch 2005; Savignac *et al.* 2022). To our knowledge, no previous studies have investigated the effect of environmental conditions on tocopherols occurring in maize kernels. However, such an impact was demonstrated by Lachman *et al.* (Lachman *et al.* 2018) in a study focusing on other cereal crops including maize, tritordeum, wheat and barley. The previous authors have concluded that high rainfall over the growing season induced in most varieties higher tocopherol levels, which supports our results.

Modern maize breeding relies on several key heterotic groups, including the four considered in the present study: Early IX/XI, European Northern Flint, Iodent and Stiff Stalk Synth. Phenotyping studies of these heterotic groups have mainly targeted traits related to yield such as ear size, kernel size and kernel number within the ear (Tolley *et al.* 2021). Dent and Flint germplasms have also been characterized by some characteristics of the kernels: kernels from the Flints have a thick, hard and vitreous outer layer whereas kernels from Dents have a high soft starch content (Unterseer *et al.* 2016). While there are numerous reports indicating that carotenoid and tocopherol composition in maize kernels is related to the genetic origin (Diepenbrock *et al.* 2017, 2021), studies addressing the metabolic diversity among heterotic groups are much less numerous and to our knowledge, no comprehensive analysis on lipophilic antioxidant contents as that performed within our work has been published before. Our results have clearly indicated that the composition in carotenoids and tocopherols exhibited some differences according to the heterotic groups. One of the most significant result was the richness in lutein and the low level in δ -tocopherol and in less extent in γ -tocopherol characterizing the kernels from the Stiff Stalk Synth group. Besides, the Early IX/XI group

seems to contain more β -cryptoxanthin and less lutein than the three others groups. Our results that did not allow evidencing a higher content in zeaxanthin neither in β -cryptoxanthin of hybrids from the European Northern Flint are not consistent with the report Saenz *et al.* (Saenz *et al.* 2021). Indeed, the previous authors have compared the carotenoid compositions of different genotypes in relation to the kernel hardness and observed that Flint genotypes contained higher concentrations in β -branch carotenoids including zeaxanthin and β -cryptoxanthin while dented hybrids were characterized by higher levels in α -branch carotenoids including lutein.

Lastly, with the aim to investigate the potential contribution of lipophilic antioxidants to GER resistance, the occurrence of correlations between carotenoid and tocochromanol composition and maize susceptibility to GER was analyzed. Our results did not allow highlighting any relationship between tocochromanol composition and GER susceptibility. This result does not support our initial conviction that these compounds known to protect plant from abiotic stresses, to act as antioxidants and antifungal compounds and to interfere with the plant hormones signaling (Savignac *et al.* 2022) could be key players of maize defense against *F. graminearum*. However, regarding carotenoids, significant differences in their composition between tolerant and susceptible genotypes were observed. In particular, zeaxanthin and β -cryptoxanthin were quantified in statistically significant higher concentrations in susceptible genotypes compared to tolerant ones and this for the two years of our study. To our knowledge, our study is the first one indicating that zeaxanthin and β -cryptoxanthin could be biochemical markers of susceptibility of maize to GER. The two previous carotenoids have been previously studied for their potential contribution to resistance to Fusarium Ear Rot caused by *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides* (Picot *et al.* 2013) but no clear link between their amount and the genotype resistance was reported. Three main mechanisms could explain the contribution of these compounds to GER susceptibility: (i) their role in abscisic acid biosynthesis and the fact that abscisic acid is known to be antagonistic to jasmonic acid signaling pathway (Robert-Seilaniantz *et al.* 2007), an important player of resistance to necrotrophic fungi (Li & Yen 2008; Gauthier *et al.* 2015; Wang *et al.* 2018), (ii) their capacity to scavenge hydroperoxides and more importantly the 13-hydroperoxides, the contribution of which to resistance to toxigenic fungi is widely documented (Gao *et al.* 2009), (iii) the importance of β -branch carotenoids in kernel hardness (Saenz *et al.*, 2021). Additional studies involving a larger range of maize varieties grown in various locations under different climatic conditions are now needed to validate the potential use of zeaxanthin and β -cryptoxanthin as a susceptibility biomarker and their integration in breeding pipelines aiming at improving maize resistance to GER and deoxynivalenol contamination.

References:

- AKOHOUE, F. & MIEDANER, T. (2022). Meta-Analysis and Co-Expression Analysis Revealed Stable QTL and Candidate Genes Conferring Resistances to FUSARIUM and GIBBERELLA ear rots while Reducing Mycotoxin Contamination in Maize. *Frontiers in Plant Science*, **13**, 1050891.
- ASWATH, C.R., KIM, S.H., MO, S.Y. & KIM, D.H. (2005). Transgenic Plants of Creeping Bent Grass Harboring the Stress Inducible Gene, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, are Highly Tolerant to Drought and NaCl Stress. *Plant Growth Regulation*, **47**, 129–139.
- ATANASOVA-PENICHON, V., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. (2016). Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to Fusarium and Mycotoxin Accumulation. *Frontiers in Microbiology*, **7**.
- BERARDO, N., MAZZINELLI, G., VALOTI, P., LAGANÀ, P. & REDAELLI, R. (2009). Characterization of Maize Germplasm for the Chemical Composition of the Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 2378–2384.
- CABRERA-SOTO, L., PIXLEY, K.V., ROSALES-NOLASCO, A., GALICIA-FLORES, L.A. & PALACIOS-ROJAS, N. (2018). Carotenoid and Tocochromanol Profiles during Kernel Development Make Consumption of Biofortified “Fresh” Maize an Option to Improve Micronutrient Nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 9391–9398.
- CALUGAR, R.E., MUNTEAN, E., VARGA, A., VANA, C.D., HAS, V.V., TRITEAN, N. & CECLAN, L.A. (2022). Improving the Carotenoid Content in Maize by Using Isonuclear Lines. *Plants*, **11**, 1632.
- CHANDER, S., MENG, Y., ZHANG, Y., YAN, J. & LI, J. (2008). Comparison of Nutritional Traits Variability in Selected Eighty-Seven Inbreds from Chinese Maize (ZEA MAYS L.) Germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 6506–6511.
- DE SANTIS, M.A., SOCCIO, M., LAUS, M.N. & FLAGELLA, Z. (2021). Influence of Drought and Salt Stress on Durum Wheat Grain Quality and Composition: A Review. *Plants*, **10**, 2599.
- DIEPENBROCK, C.H., ILUT, D.C., MAGALLANES-LUNDBACK, M., KANDIANIS, C.B., LIPKA, A.E., BRADBURY, P.J., HOLLAND, J.B., HAMILTON, J.P., WOOLDRIDGE, E., VAILLANCOURT, B., GÓNGORA-CASTILLO, E., WALLACE, J.G., CEPELA, J., MATEOS-HERNANDEZ, M., OWENS, B.F., TIEDE, T., BUCKLER, E.S., ROCHEFORD, T., BUELL, C.R., GORE, M.A. & DELLAPENNA, D. (2021). Eleven Biosynthetic Genes Explain the Majority of Natural Variation in Carotenoid Levels in Maize Grain. *The Plant Cell*, **33**, 882–900.
- DIEPENBROCK, C.H., KANDIANIS, C.B., LIPKA, A.E., MAGALLANES-LUNDBACK, M., VAILLANCOURT, B., GÓNGORA-CASTILLO, E., WALLACE, J.G., CEPELA, J., MESBERG, A., BRADBURY, P.J., ILUT, D.C., MATEOS-HERNANDEZ, M., HAMILTON, J., OWENS, B.F., TIEDE, T., BUCKLER, E.S., ROCHEFORD, T., BUELL, C.R., GORE, M.A. & DELLAPENNA, D. (2017). Novel Loci Underlie Natural Variation in Vitamin E Levels in Maize Grain[OPEN]. *The Plant Cell*, **29**, 2374–2392.
- ERENSTEIN, O., JALETA, M., SONDER, K., MOTTALEB, K. & PRASANNA, B.M. (2022). Global Maize Production, Consumption and Trade: Trends and R&D Implications. *Food Security*, **14**, 1295–1319.
- FERRIGO, D., RAIOLA, A. & CAUSIN, R. (2016). Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **21**, 627.
- GÁLVEZ RANILLA, L. (2020). The Application of Metabolomics for the Study of Cereal Corn (ZEA MAYS L.). *Metabolites*, **10**, 300.

- GAO, X., BRODHAGEN, M., ISAKEIT, T., BROWN, S.H., GÖBEL, C., BETRAN, J., FEUSSNER, I., KELLER, N.P. & KOLOMIETS, M.V. (2009). Inactivation of the Lipoxygenase ZmLOX3 Increases Susceptibility of Maize to ASPERGILLUS SPP. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, **22**, 222–231.
- GAUTHIER, L., ATANASOVA-PENICHON, V., CHÉREAU, S. & RICHARD-FORGET, F. (2015). Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against FUSARIUM GRAMINEARUM and Deoxynivalenol Accumulation. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 24839–24872.
- KURILICH, A.C. & JUVIK, J.A. (1999). Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1948–1955.
- LACHMAN, J., HEJTMÁNKOVÁ, A., ORSÁK, M., POPOV, M. & MARTINEK, P. (2018). Tocotrienols and Tocopherols in Colored-grain Wheat, Triticum and Barley. *Food Chemistry*, **240**, 725–735.
- LESLIE, J.F., MORETTI, A., MESTERHÁZY, Á., AMEYE, M., AUDENAERT, K., SINGH, P.K., RICHARD-FORGET, F., CHULZE, S.N., PONTE, E.M.D., CHALA, A., BATTILANI, P. & LOGRIECO, A.F. (2021). Key Global Actions for Mycotoxin Management in Wheat and Other Small Grains. *Toxins*, **13**, 725.
- LI, G. & YEN, Y. (2008). Jasmonate and Ethylene Signaling Pathway May Mediate Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. *Crop Science*, **48**, 1888–1896.
- LUX, P.E., FREILING, M., STUETZ, W., VON TUCHER, S., CARLE, R., STEINGASS, C.B. & FRANK, J. (2020). (Poly)phenols, Carotenoids, and Tocochromanols in Corn (ZEA MAYS L.) Kernels As Affected by Phosphate Fertilization and Sowing Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **68**, 612–622.
- MUNNÉ-BOSCH, S. (2005). The Role of A-tocopherol in Plant Stress Tolerance. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 743–748.
- NUSS, E.T. & TANUMIHARDJO, S.A. (2010). Maize: A Paramount Staple Crop in the Context of Global Nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**, 417–436.
- ORTIZ-MONASTERIO, J.I., PALACIOS-ROJAS, N., MENG, E., PIXLEY, K., TRETOWAN, R. & PEÑA, R.J. (2007). Enhancing the Mineral and Vitamin content of Wheat and Maize Through Plant Breeding. *Journal of Cereal Science*, **46**, 293–307.
- PANFILI, G., FRATIANNI, A. & IRANO, M. (2004). Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography Procedure for the Determination of Carotenoids in Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6373–6377.
- PAPENDICK, R.I. (1974). Plant Water Stress and Development of Fusarium Foot Rot in Wheat Subjected to Different Cultural Practices. *Phytopathology*, **64**, 358–363.
- PESTKA, J.J. (2010). Deoxynivalenol: Mechanisms of Action, Human Exposure, and Toxicological Relevance. *Archives of Toxicology*, **84**, 663–679.
- PICOT, A., ATANASOVA-PÉNICHON, V., PONS, S., MARCHEGAY, G., BARREAU, C., PINSON-GADAIS, L., ROUCOLLE, J., DAVEAU, F., CARON, D. & RICHARD-FORGET, F. (2013). Maize Kernel Antioxidants and Their Potential Involvement in FUSARIUM Ear Rot Resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 3389–3395.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A., NAVARRO, L., BARI, R. & JONES, J.D. (2007). Pathological Hormone Imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 372–379.

- ROUF SHAH, T., PRASAD, K. & KUMAR, P. (2016). Maize—A Potential Source of Human Nutrition and Health: A Review Ed F. Yildiz. *Cogent Food & Agriculture*, **2**, 1166995.
- SAENZ, E., BORRÁS, L. & GERDE, J.A. (2021). Carotenoid Profiles in Maize Genotypes with Contrasting Kernel Hardness. *Journal of Cereal Science*, **99**, 103206.
- SAVIGNAC, J.-M., ATANASOVA, V., CHÉREAU, S., ORTÉGA, V. & RICHARD-FORGET, F. (2022). Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxicogenic Fungal Species. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 9303.
- SCOTT, C.E. & ELDRIDGE, A.L. (2005). Comparison of Carotenoid Content in Fresh, Frozen and Canned Corn. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 551–559.
- SOBROVA, P., ADAM, V., VASATKOVA, A., BEKLOVA, M., ZEMAN, L. & KIZEK, R. (2010). Deoxynivalenol and its Toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, **3**, 94–99.
- SUN, X., MA, L., LUX, P.E., WANG, X., STUETZ, W., FRANK, J. & LIANG, J. (2022). The Distribution of Phosphorus, Carotenoids and Tocochromanols in Grains of Four Chinese Maize (ZEA MAYS L.) Varieties. *Food Chemistry*, **367**, 130725.
- TOLLEY, S.A., SINGH, A. & TUINSTRAN, M.R. (2021). Heterotic Patterns of Temperate and Tropical Maize by Ear Photometry. *Frontiers in Plant Science*, **12**.
- TRONO, D. (2019). Carotenoids in Cereal Food Crops: Composition and Retention throughout Grain Storage and Food Processing. *Plants*, **8**, 551.
- UNTERSEER, S., POPHALY, S.D., PEIS, R., WESTERMEIER, P., MAYER, M., SEIDEL, M.A., HABERER, G., MAYER, K.F.X., ORDAS, B., PAUSCH, H., TELLIER, A., BAUER, E. & SCHÖN, C.-C. (2016). A Comprehensive Study of the Genomic Differentiation between Temperate Dent and Flint Maize. *Genome Biology*, **17**, 137.
- WANG, L., LI, Q., LIU, Z., SURENDRA, A., PAN, Y., LI, Y., ZAHARIA, L.I., OUELLET, T. & FOBERT, P.R. (2018). Integrated Transcriptome and Hormone Profiling Highlight the Role of Multiple Phytohormone Pathways in Wheat Resistance against FUSARIUM Head Blight. *PLOS ONE*, **13**, e0207036.
- WILDERMUTH, G.B. & MORGAN, J.M. (2004). Genotypic Differences in Partial Resistance to Crown Rot caused by FUSARIUM PSEUDOGRAMINEARUM in relation to an Osmoregulation Gene in Wheat. *Australasian Plant Pathology*, **33**, 121–123.
- XIE, L., YU, Y., MAO, J., LIU, H., HU, J., LI, T., GUO, X. & LIU, R. (2017). Evaluation of Biosynthesis, Accumulation and Antioxidant Activity of Vitamin E in Sweet Corn (ZEA MAYS L.) during Kernel Development. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 2780.
- YANG, X., JIA, Z., PU, Q., TIAN, Y., ZHU, F. & LIU, Y. (2022). ABA Mediates Plant Development and Abiotic Stress via Alternative Splicing. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 3796.

Supplementary Figures & Tables

Supplementary Table 1. Average concentration of carotenoids for each genotype on the two years of observations. All results are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry maize kernels. <LOQ means below the limit of quantification.

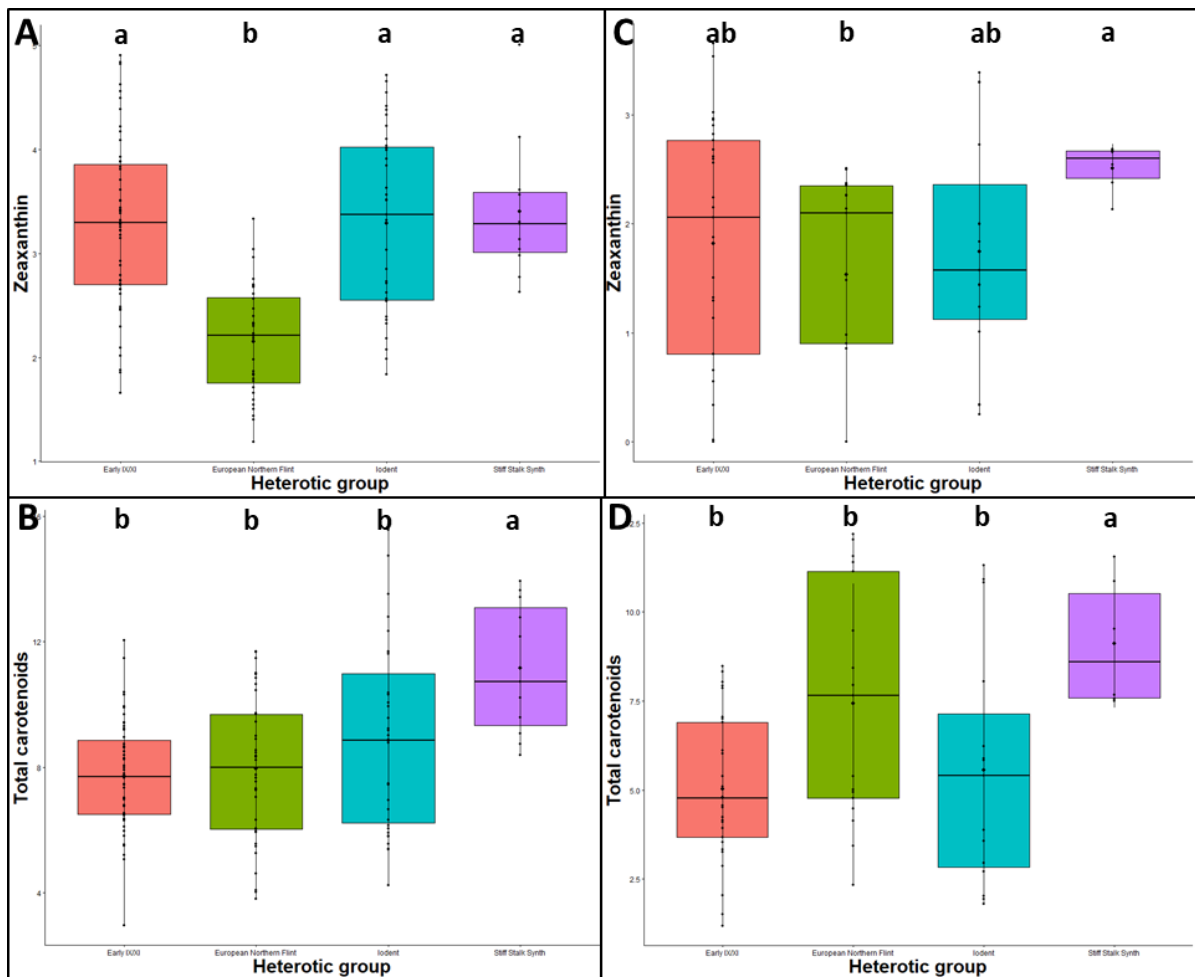
Name	Sensitivity	Heterotic group	Lutein	Zeaxanthin	β -cryptoxanthin	β -carotene	Total carotenoids
G1	S3	Early IX/XI	3.28 ± 0.48	1.69 ± 0.56	0.54 ± 0.56	0.19 ± 0.74	5.70 ± 1.32
G2	S3	Early IX/XI	3.18 ± 0.46	3.77 ± 0.60	1.47 ± 0.69	<LOQ	8.42 ± 1.20
G3	S3	Early IX/XI	2.47 ± 0.45	3.17 ± 0.76	1.64 ± 0.35	<LOQ	7.28 ± 1.41
G4	S3	Early IX/XI	3.54 ± 0.59	3.26 ± 0.72	2.01 ± 1.01	0.05 ± 0.19	8.85 ± 1.76
G5	S2	Early IX/XI	3.14 ± 0.41	3.30 ± 0.54	0.92 ± 0.50	<LOQ	7.37 ± 1.25
G6	S2	European Northern Flint	2.82 ± 0.17	1.98 ± 0.30	0.51 ± 0.49	<LOQ	5.31 ± 0.81
G7	S2	European Northern Flint	3.52 ± 0.60	1.57 ± 0.25	0.18 ± 0.50	<LOQ	5.27 ± 0.96
G8	S1	European Northern Flint	5.25 ± 0.68	2.31 ± 0.33	0.61 ± 0.39	<LOQ	8.17 ± 1.02
G9	S1	European Northern Flint	2.47 ± 0.58	1.5 ± 0.46	0.21 ± 0.58	<LOQ	4.18 ± 1.19
G10	S2	Stiff Stalk Synth	4.98 ± 0.70	2.66 ± 0.47	1.00 ± 0.60	<LOQ	8.64 ± 1.58
G11	S3	Stiff Stalk Synth	4.58 ± 0.91	3.17 ± 0.79	0.99 ± 0.59	<LOQ	8.74 ± 1.86
G12	S1	European Northern Flint	3.44 ± 0.71	1.19 ± 0.29	0.38 ± 0.57	<LOQ	5.00 ± 1.32
G13	S1	Early IX/XI	1.74 ± 0.40	3.08 ± 0.85	1.16 ± 0.46	<LOQ	5.97 ± 1.67
G14	S3	Early IX/XI	1.99 ± 0.62	3.05 ± 0.94	1.58 ± 0.22	<LOQ	6.62 ± 1.68
G15	S3	Stiff Stalk Synth	8.37 ± 0.67	2.74 ± 0.50	0.66 ± 0.58	0.10 ± 0.39	11.88 ± 1.52
G16	S3	Iodent	7.25 ± 0.67	3.71 ± 0.49	1.27 ± 0.61	<LOQ	12.23 ± 1.67
G17	S2	Iodent	2.30 ± 0.55	2.72 ± 0.38	0.48 ± 0.66	<LOQ	5.50 ± 1.40
G18	S2	Early IX/XI	4.16 ± 0.33	2.23 ± 0.27	0.59 ± 0.73	0.09 ± 0.36	7.06 ± 1.05
G19	S1	Iodent	2.96 ± 0.58	2.20 ± 0.50	1.06 ± 0.64	<LOQ	6.22 ± 1.50
G20	S3	European Northern Flint	8.12 ± 1.22	2.49 ± 0.23	0.62 ± 0.69	<LOQ	11.22 ± 1.11
G21	S1	European Northern Flint	7.55 ± 1.21	2.44 ± 0.42	0.38 ± 0.65	<LOQ	10.37 ± 1.30
G22	S3	Early IX/XI	1.49 ± 1.36	1.70 ± 1.68	1.29 ± 0.59	0.04 ± 0.15	4.52 ± 3.12
G23	S3	Early IX/XI	3.06 ± 1.16	1.33 ± 1.38	1.29 ± 0.63	<LOQ	5.68 ± 2.75
G24	S3	Early IX/XI	2.56 ± 0.85	1.86 ± 1.27	1.21 ± 0.34	<LOQ	5.63 ± 2.14
G25	S1	European Northern Flint	5.08 ± 0.24	1.07 ± 1.11	0.41 ± 0.47	<LOQ	6.56 ± 1.54
G26	S1	Iodent	3.87 ± 0.84	2.91 ± 1.16	1.18 ± 0.35	<LOQ	7.97 ± 2.27
G27	S3	Iodent	2.06 ± 1.05	1.98 ± 0.86	0.78 ± 0.31	<LOQ	4.82 ± 2.10
G28	S2	Iodent	2.97 ± 0.44	1.47 ± 1.06	0.77 ± 0.51	<LOQ	5.21 ± 1.80
G29	S1	Iodent	2.17 ± 0.87	1.38 ± 1.10	0.39 ± 0.33	<LOQ	3.94 ± 2.04
G30	S2	Early IX/XI	0.67 ± 0.69	3.56 ± 0.90	2.09 ± 0.68	<LOQ	6.32 ± 1.17
G31	S1	Early IX/XI	1.25 ± 0.84	2.22 ± 0.61	1.41 ± 0.55	<LOQ	4.88 ± 1.71
G32	S2	Early IX/XI	2.38 ± 0.82	4.00 ± 0.48	1.46 ± 0.33	<LOQ	7.84 ± 1.53
G33	S3	Iodent	4.76 ± 0.51	3.97 ± 0.55	1.41 ± 0.41	<LOQ	10.15 ± 1.27

Supplementary Table 2. Average concentration of tocopherols for each genotype on the two years of observations. All results are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry maize kernels. <LOQ means below the limit of quantification.

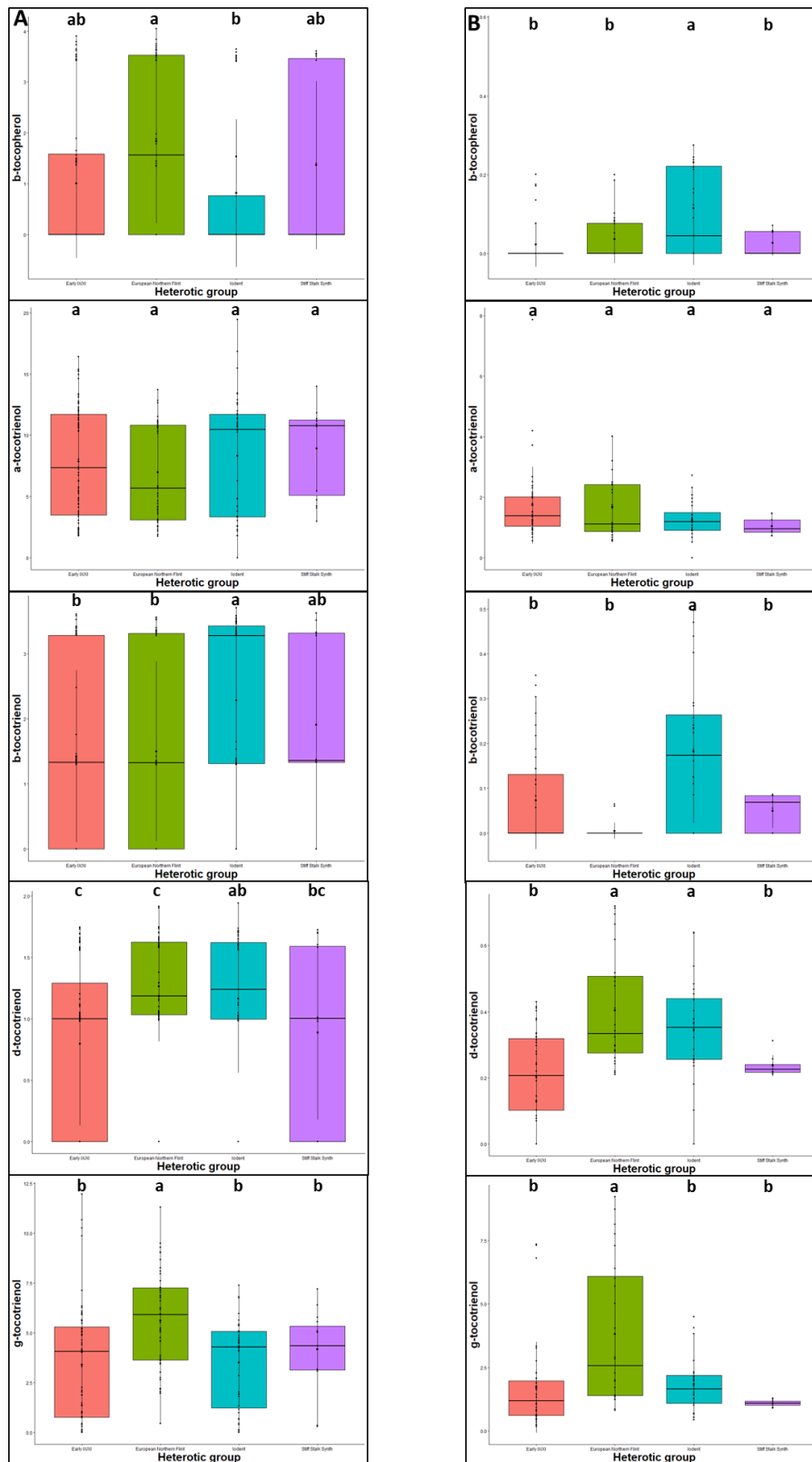
Name	Sensitivity	Heterotic group	α -tocopherol	β -tocopherol	γ -tocopherol	δ -tocopherol	Total tocopherols
G1	S3	Early IX/XI	9.60 ± 7.28	1.76 ± 1.79	15.76 ± 9.26	1.69 ± 0.68	28.81 ± 17.35
G2	S3	Early IX/XI	3.70 ± 3.82	0.43 ± 1.22	25.97 ± 12.18	1.86 ± 0.68	31.97 ± 16.71
G3	S3	Early IX/XI	3.30 ± 4.50	0.18 ± 0.46	26.91 ± 19.34	2.78 ± 1.30	33.17 ± 24.61
G4	S3	Early IX/XI	8.60 ± 8.31	1.47 ± 1.84	19.13 ± 19.02	3.19 ± 1.47	42.38 ± 29.78
G5	S2	Early IX/XI	14.27 ± 4.59	1.65 ± 1.58	25.78 ± 5.05	2.45 ± 0.10	44.16 ± 10.52
G6	S2	European Northern Flint	8.45 ± 3.33	1.41 ± 1.93	21.64 ± 2.30	2.71 ± 0.26	34.20 ± 7.16
G7	S2	European Northern Flint	7.19 ± 5.61	1.05 ± 1.38	17.72 ± 7.49	2.23 ± 0.33	28.19 ± 14.29
G8	S1	European Northern Flint	9.15 ± 9.11	1.64 ± 1.73	15.54 ± 11.68	2.24 ± 1.19	28.57 ± 22.52
G9	S1	European Northern Flint	9.65 ± 8.78	1.40 ± 1.75	14.62 ± 9.49	1.82 ± 0.90	27.49 ± 20.31
G10	S2	Stiff Stalk Synth	11.78 ± 4.36	1.19 ± 2.06	8.09 ± 4.16	1.68 ± 0.35	22.75 ± 10.54
G11	S3	Stiff Stalk Synth	8.94 ± 7.80	0.55 ± 1.16	7.22 ± 5.28	1.03 ± 0.75	17.74 ± 13.81
G12	S1	European Northern Flint	8.81 ± 6.59	0.93 ± 1.49	21.64 ± 14.32	1.88 ± 1.04	33.26 ± 22.42
G13	S1	Early IX/XI	5.24 ± 4.18	<LOQ	20.03 ± 13.86	1.62 ± 0.87	26.88 ± 19.37
G14	S3	Early IX/XI	4.09 ± 4.70	<LOQ	15.58 ± 9.44	1.91 ± 0.87	21.58 ± 14.64
G15	S3	Stiff Stalk Synth	14.13 ± 11.21	1.34 ± 1.72	17.26 ± 6.82	1.20 ± 0.79	33.94 ± 19.75
G16	S3	Iodent	6.65 ± 5.01	0.73 ± 0.51	26.06 ± 18.46	2.56 ± 1.02	35.44 ± 23.13
G17	S2	Iodent	21.99 ± 6.09	3.46 ± 2.04	26.14 ± 5.64	1.95 ± 1.12	53.54 ± 11.59
G18	S2	Early IX/XI	14.99 ± 6.33	2.18 ± 1.46	12.07 ± 3.76	1.64 ± 0.21	30.88 ± 10.91
G19	S1	Iodent	4.94 ± 4.13	<LOQ	25.71 ± 11.89	1.70 ± 0.60	31.82 ± 14.01
G20	S3	European Northern Flint	3.85 ± 3.54	0.57 ± 1.15	25.38 ± 9.22	2.36 ± 0.54	32.15 ± 12.40
G21	S1	European Northern Flint	12.11 ± 8.49	2.63 ± 1.56	13.14 ± 4.56	1.45 ± 0.55	28.45 ± 13.08
G22	S3	Early IX/XI	14.84 ± 8.77	1.92 ± 1.74	31.17 ± 10.06	1.93 ± 0.63	49.51 ± 19.11
G23	S3	Early IX/XI	8.90 ± 6.06	0.92 ± 0.84	27.01 ± 9.93	1.81 ± 0.50	38.29 ± 15.51
G24	S3	Early IX/XI	2.33 ± 1.36	<LOQ	20.08 ± 9.70	1.54 ± 0.37	22.91 ± 9.79
G25	S1	European Northern Flint	10.16 ± 8.23	2.75 ± 1.14	14.24 ± 6.55	1.86 ± 0.65	28.10 ± 15.14
G26	S1	Iodent	9.64 ± 6.41	1.89 ± 1.67	17.69 ± 6.26	2.31 ± 0.47	31.53 ± 12.13
G27	S3	Iodent	5.68 ± 4.39	0.11 ± 0.99	21.52 ± 8.10	1.56 ± 0.61	28.81 ± 11.09
G28	S2	Iodent	7.72 ± 3.48	<LOQ	30.96 ± 17.15	2.64 ± 1.63	41.32 ± 19.91
G29	S1	Iodent	5.35 ± 4.35	0.12 ± 0.11	30.75 ± 14.39	2.34 ± 0.90	37.82 ± 19.04
G30	S2	Early IX/XI	8.89 ± 2.79	<LOQ	31.94 ± 5.26	2.80 ± 1.24	42.15 ± 16.26
G31	S1	Early IX/XI	4.69 ± 4.86	<LOQ	27.29 ± 5.50	1.71 ± 0.69	32.24 ± 20.26
G32	S2	Early IX/XI	9.20 ± 4.75	1.15 ± 1.99	20.76 ± 4.72	1.88 ± 0.63	30.40 ± 8.76
G33	S3	Iodent	6.04 ± 4.34	<LOQ	25.52 ± 7.30	1.99 ± 0.58	33.55 ± 11.23

Supplementary Table 3. Average concentration of tocotrienol and total tocochromanols for each genotype on the two years of observations. All results are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry maize kernels. <LOQ means below the limit of quantification.

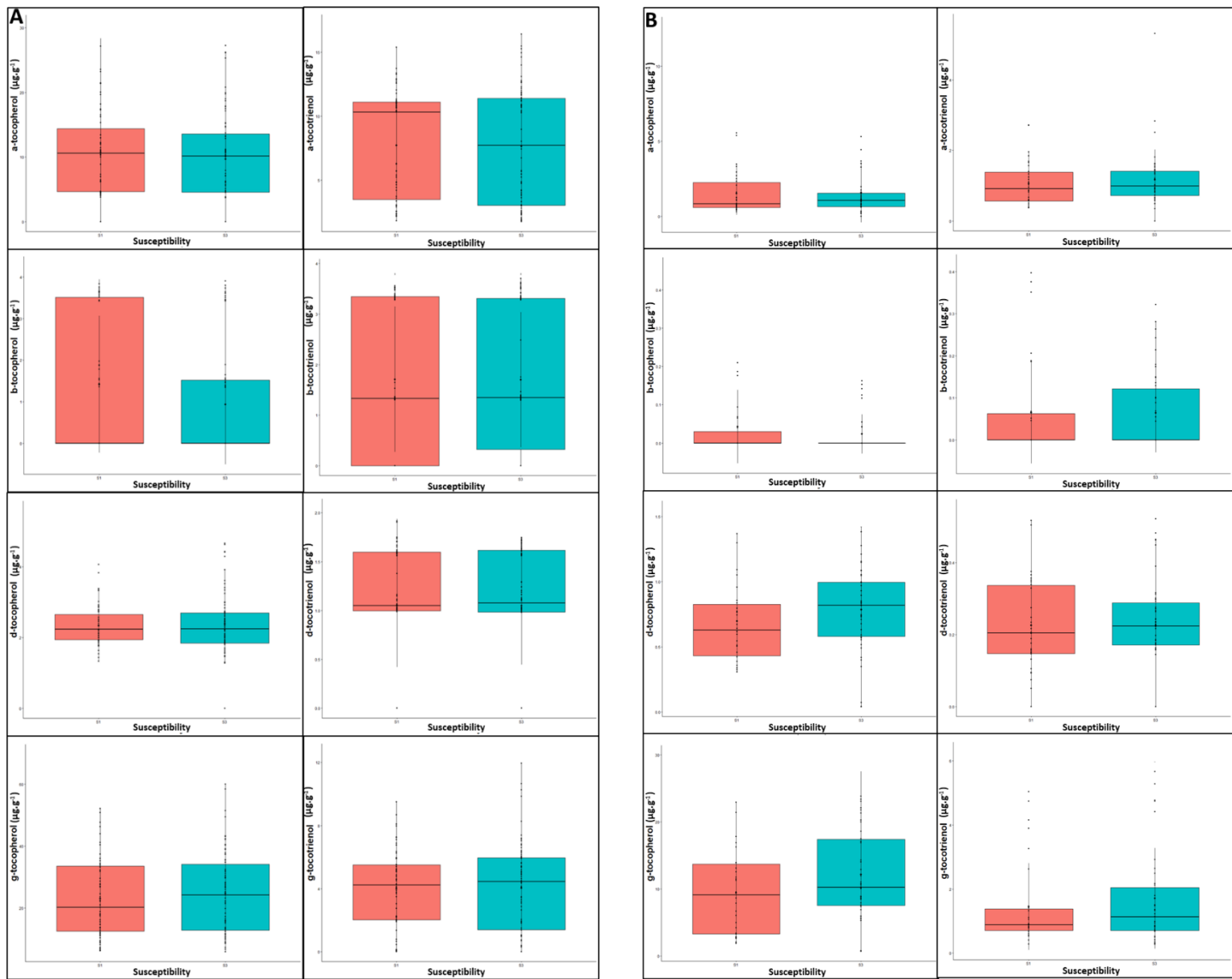
Name	Sensitivity	Heterotic group	α -tocotrienol	β -tocotrienol	γ -tocotrienol	δ -tocotrienol	Total tocotrienols	Total tocochromanols
G1	S3	Early IX/XI	7.17 ± 5.43	1.55 ± 1.55	3.25 ± 2.13	0.84 ± 0.68	12.80 ± 9.00	41.62 ± 25.26
G2	S3	Early IX/XI	4.37 ± 3.36	0.50 ± 0.69	8.78 ± 2.15	0.92 ± 0.47	14.58 ± 5.85	46.54 ± 22.34
G3	S3	Early IX/XI	5.73 ± 5.51	0.54 ± 1.20	2.82 ± 2.52	0.70 ± 0.67	9.79 ± 8.74	42.95 ± 31.47
G4	S3	Early IX/XI	6.28 ± 5.09	1.86 ± 1.35	1.91 ± 2.05	1.09 ± 0.63	11.15 ± 8.83	53.53 ± 37.92
G5	S2	Early IX/XI	9.81 ± 3.53	1.80 ± 1.34	2.09 ± 2.20	0.18 ± 0.43	13.87 ± 6.22	58.04 ± 13.71
G6	S2	European Northern Flint	8.03 ± 4.01	1.21 ± 1.37	8.69 ± 1.78	1.47 ± 0.26	19.41 ± 6.22	53.61 ± 13.17
G7	S2	European Northern Flint	6.18 ± 3.78	1.23 ± 1.24	6.21 ± 2.15	0.95 ± 0.53	14.58 ± 5.53	42.77 ± 18.29
G8	S1	European Northern Flint	5.24 ± 4.83	0.92 ± 0.49	2.75 ± 2.34	0.71 ± 0.71	9.62 ± 8.54	38.20 ± 29.48
G9	S1	European Northern Flint	4.84 ± 4.59	1.05 ± 1.45	3.41 ± 2.20	0.99 ± 0.59	10.30 ± 8.22	37.78 ± 27.15
G10	S2	Stiff Stalk Synth	8.86 ± 4.19	1.61 ± 1.77	4.80 ± 1.50	1.42 ± 0.38	16.70 ± 6.39	39.45 ± 15.68
G11	S3	Stiff Stalk Synth	6.26 ± 5.12	1.39 ± 1.31	3.72 ± 2.33	0.89 ± 0.57	12.26 ± 9.05	29.99 ± 22.36
G12	S1	European Northern Flint	4.75 ± 4.01	1.18 ± 1.36	4.58 ± 3.08	0.90 ± 0.55	11.41 ± 0.55	44.67 ± 30.31
G13	S1	Early IX/XI	5.75 ± 4.87	0.53 ± 1.14	3.26 ± 2.39	0.55 ± 0.59	10.10 ± 7.65	36.98 ± 23.84
G14	S3	Early IX/XI	6.00 ± 5.16	1.43 ± 1.51	3.54 ± 2.02	0.89 ± 0.65	11.86 ± 8.51	33.44 ± 22.08
G15	S3	Stiff Stalk Synth	6.67 ± 4.73	1.28 ± 1.64	2.42 ± 1.94	0.28 ± 0.55	10.35 ± 7.94	44.28 ± 25.91
G16	S3	Iodent	6.02 ± 5.98	1.50 ± 1.72	3.22 ± 2.54	0.55 ± 0.60	11.07 ± 9.48	46.51 ± 30.24
G17	S2	Iodent	14.70 ± 2.80	3.42 ± 1.11	4.66 ± 3.23	1.63 ± 0.64	21.42 ± 9.14	77.96 ± 24.58
G18	S2	Early IX/XI	7.99 ± 4.60	2.30 ± 1.09	2.03 ± 2.23	0.42 ± 0.68	12.75 ± 8.01	43.64 ± 18.48
G19	S1	Iodent	4.81 ± 4.45	1.74 ± 1.23	1.32 ± 1.78	0.57 ± 0.49	7.74 ± 7.21	39.56 ± 18.99
G20	S3	European Northern Flint	3.65 ± 2.69	0.66 ± 0.72	6.69 ± 2.30	1.07 ± 0.35	11.85 ± 4.06	44.01 ± 15.81
G21	S1	European Northern Flint	6.93 ± 4.29	2.06 ± 1.88	6.01 ± 1.98	1.12 ± 1.98	15.21 ± 7.19	43.66 ± 19.61
G22	S3	Early IX/XI	8.99 ± 5.53	1.58 ± 1.54	3.84 ± 2.23	1.15 ± 0.57	15.57 ± 9.20	64.08 ± 27.57
G23	S3	Early IX/XI	3.45 ± 1.63	1.08 ± 0.61	1.21 ± 0.78	0.80 ± 0.45	5.83 ± 2.39	44.13 ± 17.69
G24	S3	Early IX/XI	3.04 ± 2.95	0.67 ± 0.73	1.47 ± 1.75	0.99 ± 0.12	4.36 ± 4.07	27.27 ± 9.76
G25	S1	European Northern Flint	5.94 ± 4.63	2.39 ± 1.16	5.17 ± 1.95	1.21 ± 0.51	13.92 ± 7.79	42.02 ± 21.59
G26	S1	Iodent	6.79 ± 4.84	1.99 ± 1.40	2.31 ± 1.86	1.06 ± 0.59	12.16 ± 8.48	43.69 ± 19.22
G27	S3	Iodent	5.08 ± 4.59	1.39 ± 1.36	3.38 ± 1.59	1.03 ± 0.55	10.73 ± 7.56	39.54 ± 16.76
G28	S2	Iodent	4.22 ± 3.74	2.06 ± 1.32	2.35 ± 2.32	1.26 ± 0.37	7.95 ± 5.47	49.27 ± 22.87
G29	S1	Iodent	5.54 ± 4.48	1.74 ± 1.48	2.97 ± 1.72	1.11 ± 0.60	11.37 ± 8.06	49.19 ± 23.75
G30	S2	Early IX/XI	8.41 ± 3.56	0.70 ± 0.99	3.98 ± 2.03	0.69 ± 0.60	12.97 ± 4.64	55.12 ± 10.60
G31	S1	Early IX/XI	5.78 ± 5.65	0.66 ± 0.94	2.29 ± 2.07	0.38 ± 0.35	8.14 ± 7.39	40.37 ± 25.96
G32	S2	Early IX/XI	7.44 ± 4.77	2.33 ± 1.12	2.97 ± 2.73	1.20 ± 0.32	13.64 ± 8.52	44.04 ± 16.20
G33	S3	Iodent	6.26 ± 4.88	1.89 ± 1.47	4.80 ± 1.75	1.19 ± 0.48	14.14 ± 8.26	47.69 ± 19.09



Supplementary Figure S1. Boxplots of zeaxanthin and total carotenoids concentrations in the different heterotic groups. A: zeaxanthin concentrations in 2020 samples. B: total carotenoids concentrations in 2020 samples. C: zeaxanthin concentrations in 2021 samples. D: total carotenoids concentrations in 2021 samples. Red plots correspond to Early IX/XI heterotic group, green plots to European Northern Flint heterotic group, blue plots to Iodent heterotic group and purple to Stiff Stalk Synth heterotic group. Statistical analyses were performed by ANOVA and differences between heterotic groups were determinate with Newman-Keuls method. Values are expressed in μg of carotenoid per g of maize kernel.



Supplementary Figure S2. Boxplots of tocochromanols concentrations in heterotic groups. A β -tocopherol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol concentrations in 2020 samples. B: β -tocopherol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol concentrations in 2021 samples. Red plots correspond to Early IX/XI heterotic group, green plots to European Northern Flint heterotic group, blue plots to Iodent heterotic group and purple to Stiff Stalk Synth heterotic group. Statistical analyses were performed by ANOVA and differences between heterotic groups were determined with Newman-Keuls method. Values are expressed in μg of tocochromanols per g of maize kernel.



Supplementary Figure S3. Boxplots of tocopherols for the two years of harvest of S1 and S3 genotypes. A: Boxplots of α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol made with observations of 2020 harvest. B: Boxplots of α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol and γ -tocotrienol made with observations of 2021 harvest. Red boxplots correspond to tolerant genotypes and blue boxplots correspond to susceptible genotypes. Values are expressed in μg of tocopherols per g of maize kernel. Statistical analysis was using pairwise Wilcoxon test and shows no differences between susceptibility and tolerance.

Chapitre 3 :
**Activité antifongique et anti-mycotoxine des
antioxydants lipophiles présents dans les grains de
maïs (*Zea mays*).**

Chapitre 3 : Activité antifongique et anti-mycotoxine des antioxydants lipophiles présents dans les grains de maïs (*Zea mays*).

Les antioxydants lipophiles tels que les tocopherols et les caroténoïdes font partie des métabolites secondaires majeurs des grains de maïs. La comparaison de la composition en antioxydants lipophiles de grains récoltés à maturité issus de 20 géotypes a montré que les caroténoïdes pourraient être liés à la sensibilité du maïs au champignon *F. graminearum* (chapitre 2). Même si ces composants des céréales sont parmi ceux qui possèdent le plus fort potentiel antioxydant, donc susceptibles de jouer un rôle important dans les mécanismes de défense du maïs vis-à-vis de cet agent pathogène, aucune étude, à notre connaissance, ne leur a été consacrée. Les résultats des travaux publiés sur leur effet antifongique et anti-mycotoxine vis-à-vis de différentes espèces de pathogènes fongiques sont souvent contradictoires, dépendant des mycotoxines (Masood *et al.* 1994; Santos *et al.* 2010; Picot *et al.* 2013). Dans ce chapitre 3, nous avons testé l'effet des principaux antioxydants lipophiles des grains de maïs sur la croissance et la toxigénèse de *F. graminearum* en cultures liquides. Pour préciser l'origine des mécanismes mis en jeu dans les modulations observées, l'analyse de la régulation de l'expression de gènes clefs (biosynthèse des trichothécènes de type B et gènes de réponse au stress oxydant) induite par l'exposition à ces composés lipophiles a été réalisée.

Ce chapitre sera organisé selon le plan suivant :

Chap.3 I) Article scientifique (soumis à J Agric Food Chem): "Carotenoids occurring in maize affect the redox homeostasis of *Fusarium graminearum* and its production of mycotoxins: new insights supporting their role in maize resistance to *Gibberella* Ear Rot."

Chap.3 II) Données complémentaires sur les antioxydants lipophiles non considérés dans l'article :

- A- Etude de l'effet antifongique et anti-mycotoxine de la lutéine, zéaxanthine, β -cryptoxanthine et du β -carotène.
- B- Etude de l'effet antifongique et anti-mycotoxine des principaux tocopherols des grains de maïs

Chap.3 III) Conclusion générale du chapitre 3

Chap.3 I) Carotenoids occurring in maize affect the redox homeostasis of *Fusarium graminearum* and its production of mycotoxins: new insights supporting their role in maize resistance to *Gibberella* Ear Rot

1 **Carotenoids occurring in maize affect the redox homeostasis of *Fusarium graminearum***
2 **and its production of mycotoxins: new insights supporting their role in maize resistance to**
3 ***Giberella* Ear Rot.**

4 Journal of Agricultural and Food Chemistry

5 Jean-Marie SAVIGNAC, Vessela ATANASOVA, Sylvain CHEREAU, Christine DUCOS, Nathalie
6 GALLEGOS, Véronique ORTEGA, Nadia PONTS, Florence RICHARD-FORGET*

7 **Keywords:** *Fusarium graminearum*, carotenoids, toxin production, TCTB, gene expression

8 **Abstract**

9 *Fusarium graminearum* is the causal agent of Gibberella ear rot (GER) in maize, a devastating
10 fungal disease resulting in yield reduction and contamination of grains with type B
11 trichothecene mycotoxins (TCTB). Reducing GER damage requires the implementation of an
12 integrated management strategy in which the use of resistant maize genotype is a key pillar.
13 The present study aimed at providing new phenotyping tools to improve breeding pipelines
14 by investigating the yet understudied contribution of carotenoids to GER resistance. Here we
15 demonstrated for the first time the efficiency of carotenoid extracts from various maize
16 genotypes to inhibit the production of TCTB by *F. graminearum*. We further suggested that
17 zeaxanthin could be a key actor of this inhibition efficiency, notably *via* a negative
18 transcriptional control of several biosynthetic genes of the TCTB pathway. Besides, we
19 demonstrated that zeaxanthin treatments led to profound perturbations in the fungal redox
20 homeostasis by affecting the expression of key genes encoding ROS detoxifying enzymes,
21 several of them being involved in *F. graminearum* virulence during plant infection. Altogether,
22 our data support the contribution of carotenoids to the mechanisms employed by maize to
23 counteract *F. graminearum* infection and its production of TCTB.

24 Introduction

25 *Fusarium graminearum* is the causal agent of the Gibberella ear rot (GER) disease, a
26 frequent and important fungal disease affecting maize production worldwide¹. In addition to
27 yield losses, *F. graminearum* infection may lead to the contamination of grains with
28 mycotoxins. Indeed, *F. graminearum* is a well-known producer of mycotoxins that include
29 zearalenone and type B trichothecenes / TCTB (mainly represented by deoxynivalenol / DON
30 and its 15 - or 3 - acetylated forms / 15ADON and 3ADON)². DON which is frequently observed
31 in maize harvests and is highly difficult to eliminate once accumulated in kernels is of major
32 concern. Teratogenicity, cytotoxicity, genotoxicity and immunotoxicity effects have been
33 associated with a DON chronic exposure while acute exposure to high doses can induce severe
34 dysfunction of the gastrointestinal track and may ultimately result in death³. With the
35 objective of consumer's protection, a maximum DON contamination levels acceptable for
36 unprocessed maize and maize-based food have been set by the European Commission in June
37 2005 (EC No. 856/2005) and revised in July 2007 (EC No. 1126/2007).

38 Climate is acknowledged as the main factor driving the colonization of maize ears by
39 toxigenic *Fusarium* species and the contamination of kernels with mycotoxins⁴. Various
40 preventive techniques and agricultural practices, including crop rotation, residues
41 management, fungicide application and choice of tolerant cultivars, have been recommended
42 to minimize the level of DON in maize harvests⁵. While these strategies show a certain
43 efficiency, they are however not always sufficient to guarantee the compliance with the
44 European safety regulations. According to the participants of a Nominal Group Discussion
45 described in Leslie et al.⁵, one of the most promising approaches to mitigate the issue of
46 mycotoxins in maize involves the use of maize cultivars with an increased tolerance to *F.*

47 *graminearum* in tandem with the above-mentioned agronomic practices. Improving the
48 resistance of maize cultivars is however very challenging as a result of its polygenic nature, its
49 dependence to environment⁶ and the lack of current cost-effective phenotyping tools. Indeed,
50 screening is generally done using spray inoculation of spores of *F. graminearum* in a restricted
51 set of environments, which is reported to lead to inconsistent ranking of genotypes over years.
52 To assist breeding programs, there is a need to increase the knowledge regarding the
53 mechanisms maize employs to counteract *F. graminearum* and its production of mycotoxins.
54 A large part of these mechanisms relies on specialized metabolites deriving from the
55 shikimate, acetate-mevalonate and methylerythritol phosphate pathways⁷. Among these
56 metabolites, phenylpropanoids have been intensively investigated and suggested to be key
57 actors of plant resistance to *F. graminearum*⁸⁻¹⁰ while less is known regarding the role of
58 carotenoids, a class of tetraterpenoids. Maize kernels are frequently described as a rich source
59 of carotenoids, with lutein and zeaxanthin being the prevalent compounds¹¹⁻¹³. The
60 hypothesis that carotenoids could significantly contribute to maize resistance to GER is
61 supported by various arguments that include: (i) the interconnection between carotenoid and
62 abscisic acid biosynthetic pathways, abscisic acid being acknowledged for its key contribution
63 to plant-pathogen interactions¹⁴, (ii) the antioxidant properties of carotenoids and more
64 precisely their capacity to quench various Reactive Oxygen Species (ROS) and notably the lipid
65 peroxy radical (LOO•), which contributes to protection of plant cell membranes¹⁵, (iii) the
66 likely potential of carotenoids to reduce mycotoxin yield⁹ as a result of their antioxidant
67 properties and the reported stimulating effect of ROS on the biosynthesis of various
68 mycotoxins including DON¹⁶. This last argument remains however poorly documented and
69 most of the published reports describing an inhibitory effect of carotenoids on mycotoxin
70 production have focused on *Aspergillus species* and aflatoxin or ochratoxin yield¹⁷⁻¹⁹.

71 The present work was aimed at providing new insights on the role of carotenoids
72 occurring in maize in resistance to *F. graminearum* and DON accumulation. As a first step, the
73 antifungal and anti-mycotoxin activity of carotenoid crude extracts from maize kernels
74 showing contrasted carotenoid patterns was evaluated. In a second step, pure carotenoid
75 compounds (zeaxanthin) were considered and transcriptional control of key DON biosynthetic
76 genes but also of genes involved in *F. graminearum* oxidative stress response were
77 investigated. Our results shows that carotenoids extracted from maize kernels, particularly
78 zeaxanthin, are implicated in the reduction of mycotoxin production and gene expression
79 related to this mechanism in *F. graminearum*.

80 **Material and Methods**

81 **Pure compounds and reagents**

82 Zeaxanthin, lutein, β -apo-8'-carotenal, β -cryptoxanthin and β -carotene were purchased from
83 Extrasynthese (Genay, France). Standards of TCTB were purchased from Romer Labs (Tulln,
84 Austria). Solvents (methanol (MeOH), acetonitrile, dichloromethane, chloroform) were
85 purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Reagents (butylated hydroxytoluene,
86 potassium hydroxide) used for carotenoid and RNA extractions were purchased from Scharlau
87 (Barcelona, Spain), Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), MP Biomedicals (Illkirch,
88 France) and Thermo Fischer Scientific (Illkirch, France).

89 **Plant material and field management**

90 Plant material consists in 31 inbred lines (called S1 to S31) provided by Syngenta® Seeds
91 Company. The 31 inbred lines were grown in 2021 in a field trial located at Garlin, in the
92 southwest of France. Inbred lines were cultivated in two blocks, each block containing 20
93 plants of the 31 inbred lines. All plants were open pollinated. Three maize ears per inbred line

94 were collected at the maturity stage and kernels were immediately dried to 13% moisture
95 content. Ears were then shelled, pooled by genotype, grinded with centrifugal mill Retsch ZM
96 200 (Eragny, France) on size <0.5 mm and stored at -20°C. Three homogenous samples per
97 pool were used for carotenoids extractions.

98 **Carotenoid extraction and quantification**

99 The extraction and quantification procedures were adapted from Picot et al²⁰. Carotenoids
100 were extracted from 600 mg of dried and grounded maize kernels by adding 3 mL of methanol
101 that contained 0.1% of butylated hydroxytoluene (BHT, w/v), followed by vortexing for 20 s
102 and shaking for 10 min at 50 rpm. Then, 1.8 mL of 12% (w/v) KOH were added to the
103 supernatant in order to saponify potentially interfering oils. Samples were vortexed for 30 s
104 and agitated for 30 min. Following saponification, an internal standard, namely β -apo-8'-
105 carotenal (50 μ L, 100 μ g.mL⁻¹), was added. Carotenoids were then extracted three times with
106 hexane layers (1.8 mL) after centrifugation for 10 min at 3000g. The organic layer was then
107 evaporated to dryness under a nitrogen stream. All steps of extraction were realized with low
108 luminosity. Dried samples were reconstituted in 200 μ L of methanol, filtrated using 0.2 μ m
109 filters (acrodisc 13mm minispike with 0.2 μ m PTFE, Pall Corporation, Saint-Germain-en-Laye,
110 France) and transferred in amber vials for analysis.

111 Crude extracts of carotenoids used for fungal culture supplementation were obtained from
112 240g of kernels of 10 genotypes with contrasted carotenoid composition (namely S2, S4, S14,
113 S16, S17, S18, S20, S22, S25, S29). Crude extracts of carotenoids were extracted according to
114 the same protocol as previously described and adapted for 240 g of dried maize.

115 Carotenoids were quantified by Liquid Chromatography coupled to Photodiode Array
116 Detector (LC-DAD) using an Agilent Technologies 1100 series system equipped with an auto

117 sampler system, an Agilent DAD detector and the ChemStation chromatography manager
118 software Rev. A.10.02 (Agilent, Les Ulis, France). Separation of compounds was achieved on a
119 Develosil RPAQUEOUS column (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) (Phenomenex, Le Pecq, France),
120 maintained at 30°C. The mobile phase consisted of acetonitrile/chloroform (80/20, v/v).
121 Isocratic elution was performed at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ for 40 min. The injection volume
122 was 5 μL . The UV-visible spectra were recorded from 190 to 500 nm and peak areas were
123 measured at 450 nm. Quantification was performed by external calibrations with standard
124 solutions prepared from commercial pure powders. Standards of β -apo-8'-carotenal, β -
125 cryptoxanthin were dissolved in methanol / acetonitrile (50/50, v/v) from 1 to 50 mg.L⁻¹ for β -
126 apo-8'-carotenal and from 0.5 to 25 mg.L⁻¹ for β -cryptoxanthin. Standards of lutein, zeaxanthin
127 and β -carotene were dissolved in methanol/acetonitrile/dichloromethane (25/25/50, v/v/v)
128 from 3.25 to 50 mg.L⁻¹. These standards were used as external calibration curves.

129 **Fusarium strain and culture conditions**

130 The *F. graminearum* CBS 185.32 strain (Westerdijk Institute, The Netherlands) was selected
131 for its capacity to produce high concentrations of DON and 15ADON and was used throughout
132 the study. Stock cultures were maintained at 4 °C on potato dextrose agar (PDA). When
133 inoculum was required, the fungal strain was grown on PDA plates at 25 °C in the dark for 5
134 days, and spore suspensions prepared with six plugs of fungus in 50mL carboxymethyl
135 cellulose (CMC) liquid medium (15 g CMC, 1 g Yeast extract, 0.5 MgSO₄, 7 H₂O, 1 g NH₄NO₃, 1
136 g KH₂PO₄, for 1 L medium) and incubated in darkness at 25 °C and at 180 rpm in a Multitron
137 incubator shaker (INFORS AG, Bottmingen, Switzerland). After 3 to 5 days, the conidia were
138 harvested by filtration through Sefar Nitex 03–100 (SEFAR AG, Heiden, Switzerland),
139 recovered using centrifugation (2300 $\times g$ for 10 min), counted in a Malassez cell and diluted
140 with sterile MS-glucose medium (20 g Glucose, 0.5 g KH₂PO₄, 0.6 g K₂HPO₄, 17 mg MgSO₄, 1

141 g (NH₄)₂SO₄, 10 mg Vogel mineral salts solution, for 1 L medium) to a final concentration for
142 inoculation at 10⁴ spores.mL⁻¹. Liquid-culture experiments were performed in 55 mm petri
143 dishes containing 8 mL of MS-glucose medium, supplemented with carotenoid pure solutions
144 at concentrations 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 or 0.2 mM or 240 μL of carotenoid crude per petri dish
145 extracts from maize. It was verified there is no pH variation between treatments conditions
146 and control. Fungal liquid cultures were incubated at 25°C in the dark for 12 days. Following
147 incubation, mycelia were recovered by centrifugation and fungal biomass was measured by
148 weighing the mycelia after 48 h of drying at 80°C. Culture media were stored at -20°C until
149 TCTB analysis. Five replications were made for each condition and appropriate positive and
150 negative controls for each study were performed.

151 **TCTB extraction and analysis**

152 The procedure was adapted from the previously published protocol²¹. Briefly, 3 mL sample of
153 culture medium was extracted with 6 mL of ethyl acetate. A volume of 5 mL of the organic
154 phase was evaporated to dryness at 45 °C under nitrogen flux. Dried samples were dissolved
155 in 200 μL of methanol/water (1/1, v/v) and filtered through a 0.2 μm filter before analysis.
156 TCTB were quantified by LC-DAD using an Agilent Technologies 1100 series liquid
157 chromatograph as described above. Separation was achieved on a Kinetex XB-C18 100 Å
158 column (4.6 × 150 mm, 2.6 μm) (Phenomenex, France) maintained at 45 °C. The mobile phase
159 consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow was kept at 0.7 mL.min⁻¹.
160 The injection volume was set to 5 μL. TCTB were separated using a gradient elution as follows:
161 7–30% B in 6 min, 30–90% B in 2 min, 90% B for 2 min, 90–7% B for 1 min, 7% B for 6 min. The
162 peak areas were measured at 230 nm. Quantification was performed by external calibration
163 with standard solutions. Toxin yields were expressed in μg. g⁻¹ of fungal dry biomass.

164 RNA extraction and analysis

165 Total RNA was extracted from 3 and 5-day-old mycelia of *F. graminearum* CBS 185.32
166 cultivated in MS-glucose media supplemented or not with 0.1mM of zeaxanthin. Mycelia were
167 harvested by culture filtration. Three biological replicates were prepared for each condition.
168 Control condition was supplemented with 0.2% of methanol. Mycelia were frozen
169 immediately in liquid nitrogen. Flash-frozen mycelia (10 mg for 3-day-old mycelia and 25 mg
170 for 5-day-old mycelia) were ground during 1.30 min at 30Hz (TissueLyser™, Qiagen, Venlo,
171 The Netherlands) with steel beads (5mm) in 1 mL of TRIzol (Invitrogen, USA). Total RNA
172 (separated from the beads and cell debris) was extracted following manufacturer's
173 instructions. A DNase treatment was realized with the ezDNase kit following the instructions
174 of the manufacturer (Invitrogen, USA). The quality of the prepared RNA was evaluated by E-
175 gel® EX 1% agarose (Invitrogen, USA). The RNA was quantified by spectrometry (DeNovix,
176 DeNovix Inc, Wilmington DE, USA). The absence of contamination with genomic DNA was
177 verified by qPCR (QuantStudio5™; ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland) on 1 µL total RNA
178 (20 ng) mixed with 9 µL of reaction mix using the Power Track SYBR® Green Master Mix
179 (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania) containing 0.5 µM of target's primers. RNA integrity
180 was verified by agarose gel electrophoresis of 2 µg of heat-denatured total RNA ran for 7 min
181 on an E-gel® EX 1 % agarose (Invitrogen, USA). Total RNA concentrations were measured by
182 fluorescence with Quantifluor® RNA System (Promega, USA) on a DeNovix system (DeNovix
183 Inc, Wilmington DE, USA).

184 Gene expression analysis

185 Reverse transcription was performed with the SuperSript™ IV First-Strand Synthesis System
186 kit (Invitrogen, Vilnius, Lithuania) according to the supplier's protocol. The cDNA samples were

187 stored at -20°C until their use for PCR analysis. qPCR analyses were performed with a
 188 QuantStudio5™ (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland) using 1 μL of cDNA mixed with 9 μL
 189 of reaction mix prepared using the Power Track SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems,
 190 Vilnius, Lithuania). The forward and reverse primers used for the genes targeted in the study
 191 are reported in Table 1. Their final concentration in the reaction mix was 0.5 μM . The PCR
 192 cycling conditions were set at 95°C for 2 min, $40 \times (95^{\circ}\text{C}$ for 5 s, 60°C for 30 s). The melting
 193 curves were acquired by heating the samples to 95°C for 1 s, cooling to 60°C for 20 s and then
 194 slowly increasing the temperature from 60°C to 95°C at the rate of $0.15^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$, with a
 195 continuous measurement of the fluorescence. Amplification and melting curve data were
 196 generated and analyzed using the QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1
 197 (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland). For each gene, the efficiency was evaluated using
 198 serial dilutions of cDNA samples. The expression levels of the genes studied, normalized with
 199 the expression of the reference genes *Citrate Synthase* and *H3* (Histone 3) and expressed in
 200 comparative value of control condition, were determined with SATqPCR tool²².

201 **Table1.** Genes used for RNA analysis.

202

name	Protein	gene_id_FGDB57	Forward	Reverse
H3	Histone	FGRAMPH1_01G14931	AAGAAGCCTCACCGCTACAA	TCGAAGAGGGAGACGAGGTA
Citrate Synthase	citrate synthase	FGRAMPH1_01G03497	GGCTCACCGAGTTCAAGAAG	CTTCTCTGGGCAAAAGTGC
FgLox1	13S lipoxygenase	FGRAMPH1_01G05341	AGATCCCAACGTTTCCACC	CCTTCTCTGTGTAGCCCTGC
FgCat1	Catalase	FGRAMPH1_01G22571	GGAAAGCCAGAACCAACAA	CGTTGACGAGAGTGTAGGTGTTGA
FgCat2	Catalase	FGRAMPH1_01G11527	TCTCTCCCTCAACATGGTC	CAGGGTGCAGTAGACTTGGTT
FgCat3	Catalase	FGRAMPH1_01G23035	CCAAGGCTCTAAGAAGGCA	GCCCCAATGATAACCGTCCA
FgCat4	Catalase	FGRAMPH1_01G22669	GGCTAGATCTGAGTCCGC	TGAAAGGACAGTTGACGGGG
FgCat5	Peroxisomal catalase	FGRAMPH1_01G18533	GATCCCGCCAAGTTTCTCA	GTGTCCAGAGTAACCGTGCA
FgPCat1	Peroxidase/catalase 2	FGRAMPH1_01G11747	AAGGATGCCGGTGTAAACGT	CTGAGAGTGAGAAGCTGGGC
FgPCat2	Peroxidase/catalase 2	FGRAMPH1_01G13859	CTGTCCCTGCCTACAAGTG	AGCAATGAAGTCTTTGGCGA
FgCuSOD1	superoxide dismutase	FGRAMPH1_01G01467	CCGCTCCTTCGCTTCATT	GGAGGCCGGTACTTTAGAGC
FgCuSOD2	superoxide dismutase	FGRAMPH1_01G10657	GTGCTCCTTCTGACGAGACC	TCACCCTTGCCAAGATCGTC
FgFeSOD1	superoxide dismutase	FGRAMPH1_01G23885	AGCCCTTCTGTGCTAAAC	AGGTCGTAGCACTCCTGACT
FgMnSOD1	superoxide dismutase	FGRAMPH1_01G04949	ATCTCAAAGCGTGGGGCAG	AGGTAGTAGGCATGCTCCCA
FgMnSOD2	superoxide dismutase	FGRAMPH1_01G15331	CTGGCACTCTGTCCATCGTT	GACAGTGCCCAAGTTGATGA
Tri4	trichodiène oxygénase	FGRAMPH1_01T13107	TATTGTTGGCTACCCCAAGG	TGTCAGATGCGCCTTACAAA
Tri5	trichodiène synthase	FGRAMPH1_01T13111	AGAAGCTCACCCAGGAAACC	TGGCGTCTCTGTATTCCTGA
Tri6	facteur de transcription	FGRAMPH1_01T13109	TTCACAGGCCAAGCAAATG	CTTTGGTGCCGACTTCTTGC
Tri12	transporteur membranaire	FGRAMPH1_01T13119	TTCACCGCCGCTTCATAT	AGTGCTGTCGTCATCCCAAG

203

204

205 Expression of results and statistical analyses

206 Principal component analysis (PCA) and statistical analyses of fungal growth and toxin
207 production were performed using R x64 4.1.4 and RStudio software v 1.3.1093 (Boston, USA).
208 Results of carotenoids were reported as mean values \pm standard deviation of three biological
209 replications, fungal growth and TCTB production were reported as mean values \pm standard
210 deviation of five biological replications. Normal distribution of the values was tested with
211 Shapiro-Wilk tests. One-way analyses of variance test (ANOVA) for TCTB and fungal biomass
212 were carried out for normally distributed values obtained on crude extract tests and
213 differences between control and treated conditions were determined with multiple
214 comparison tests using the Tukey method. For experimentations with non-normally
215 distributed values obtained on experiments with different concentrations of carotenoids,
216 Kruskal-Wallis tests were carried out and statistics were realized with pairwise Wilcoxon test.
217 The relationship between fungal biomass, toxin production and carotenoid levels was
218 investigated using the Pearson correlation coefficient. For all tests, the level of significance
219 was set at $p \leq 0.05$.

220 Results**221 Carotenoid contents of maize kernels**

222 Carotenoid composition of 31 maize genotypes was analyzed using LC/DAD (Table 2). Three
223 major peaks with UV-visible spectra exhibiting a maximum at 450 and 480 nm were
224 unequivocally identified as lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin by comparison with
225 retention times and absorption spectra of reference standards and quantified using their
226 respective external calibration curves. One additional peak was ascribed to β -carotene but,

227 for all genotypes, its amount was below the limit of quantification of the analytical method
228 we used ($3.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

229 Total carotenoid concentrations were in the range of 1.57 and $11.78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of maize and
230 showed substantial differences between genotypes. According to the total carotenoid
231 content, the 31 genotypes can be classified as follows: genotypes with low carotenoid levels -
232 between 1.5 and $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - (S9, S22, S23, S24, S27, S28, S29, S31), genotypes with average
233 carotenoid levels - between 4 and $7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - (S1, S3, S5, S6, S7, S12, S13, S14, S17, S18, S19,
234 S25, S26, S30) and genotypes with high carotenoid levels - between 7 and $12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ - (S2, S4,
235 S8, S10, S11, S15, S16, S20, S21). For most genotypes, lutein was the predominant carotenoid
236 followed by zeaxanthin and β -cryptoxanthin. However, in the S13, S14 and S31 genotypes,
237 zeaxanthin was the most abundant compound with concentrations of 2.46 , 2.30 and $1.73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,
238 respectively. In the S2, S3, S4, S5, S17 and S27 genotypes, lutein and zeaxanthin were
239 quantified at similar levels, reaching about $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ with exception of S27 for which lutein and
240 zeaxanthin concentrations were close to $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

241 The PCA score plot (Figure 1) shows the distribution of genotypes according to their
242 carotenoid composition in the area defined by the first two components (PC1 and PC2), which
243 explained 50 and 41% respectively of the total variance. The clustering of the three biological
244 replicates per maize genotype is clearly visible, as well as strong differences in carotenoid
245 composition between genotypes.

246 The observation of the loading plot (Figure 1) allows evidencing the opposite contribution of
247 lutein and β -cryptoxanthin to PC1, while zeaxanthin was shown to positively contribute to
248 PC2. According to this distribution on PCA, we decided to separate genotypes in four groups
249 (colored in able 2). The first group that includes the S13, S14, S30 and S31 genotypes (colored

250 in very light gray) is characterized by average levels of total carotenoids (around 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and
 251 a high proportion of zeaxanthin (ratio lutein/zeaxanthin around 0.3-0.6). The second group of
 252 genotypes including S2, S3 and S4 (colored in light gray) is characterized by high levels of total
 253 carotenoids (around 7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and lutein/zeaxanthin ratio close to 1. The third group includes
 254 the S15, S16, S20 and S21 genotypes (colored in dark grey). These samples contain very high
 255 concentration in total carotenoids, around 11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ with lutein as predominant compound (7-
 256 9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

257 **Table 2.** Mean concentrations of carotenoids extracted from maize kernels of 31 inbred
 258 lines.

Sample	Concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry matter)				Total carotenoids
	Lutein	Zeaxanthin	β -cryptoxanthin	β -carotene	
S1	3.19 \pm 0.31	1.25 \pm 0.10	0.19 \pm 0.32	<LOQ	4.62 \pm 0.16
S2	2.92 \pm 0.26	3.4 \pm 0.34	1.53 \pm 0.15	<LOQ	7.86 \pm 0.73
S3	2.35 \pm 0.18	2.82 \pm 0.20	1.50 \pm 0.12	<LOQ	6.67 \pm 0.48
S4	3.27 \pm 0.16	2.85 \pm 0.10	1.93 \pm 0.06	<LOQ	8.05 \pm 0.25
S5	3.06 \pm 0.18	3.1 \pm 0.16	0.71 \pm 0.07	<LOQ	6.87 \pm 0.40
S6	2.87 \pm 0.16	1.87 \pm 0.07	0.24 \pm 0.21	<LOQ	4.99 \pm 0.44
S7	3.88 \pm 0.12	1.59 \pm 0.03	<LOQ	<LOQ	5.48 \pm 0.15
S8	5.44 \pm 0.29	2.25 \pm 0.11	0.32 \pm 0.01	<LOQ	8.01 \pm 0.39
S9	2.38 \pm 1.28	1.17 \pm 0.44	<LOQ	<LOQ	3.55 \pm 1.72
S10	4.49 \pm 0.55	2.37 \pm 0.26	0.70 \pm 0.08	<LOQ	7.56 \pm 0.82
S11	4.17 \pm 0.05	2.67 \pm 0.01	0.74 \pm 0.05	<LOQ	7.58 \pm 0.09
S12	3.06 \pm 0.49	0.95 \pm 0.05	<LOQ	<LOQ	4.01 \pm 0.53
S13	1.52 \pm 0.18	2.46 \pm 0.28	0.89 \pm 0.19	<LOQ	4.87 \pm 0.65
S14	1.48 \pm 0.22	2.30 \pm 0.28	1.48 \pm 0.17	<LOQ	5.26 \pm 0.66
S15	8.17 \pm 0.77	2.35 \pm 0.21	0.13 \pm 0.15	<LOQ	10.65 \pm 1.04
S16	6.88 \pm 0.15	3.33 \pm 0.05	0.82 \pm 0.09	<LOQ	11.02 \pm 0.25
S17	2.37 \pm 0.30	2.60 \pm 0.27	0.02 \pm 0.02	<LOQ	4.99 \pm 0.60
S18	4.28 \pm 0.11	2.22 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	<LOQ	6.68 \pm 0.08
S19	3.07 \pm 1.03	2.05 \pm 0.65	0.81 \pm 0.41	<LOQ	5.94 \pm 2.09
S20	9.21 \pm 0.37	2.42 \pm 0.14	0.14 \pm 0.06	<LOQ	11.78 \pm 0.56
S21	8.54 \pm 1.01	2.27 \pm 0.15	<LOQ	<LOQ	10.82 \pm 1.16
S22	0.18 \pm 0.16	0.12 \pm 0.19	1.27 \pm 0.14	<LOQ	1.57 \pm 0.43
S23	1.92 \pm 0.33	<LOQ	1.28 \pm 0.15	<LOQ	3.20 \pm 0.47
S24	1.81 \pm 0.24	0.67 \pm 0.12	1.22 \pm 0.03	<LOQ	3.70 \pm 0.39
S25	5.11 \pm 0.25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5.11 \pm 0.25

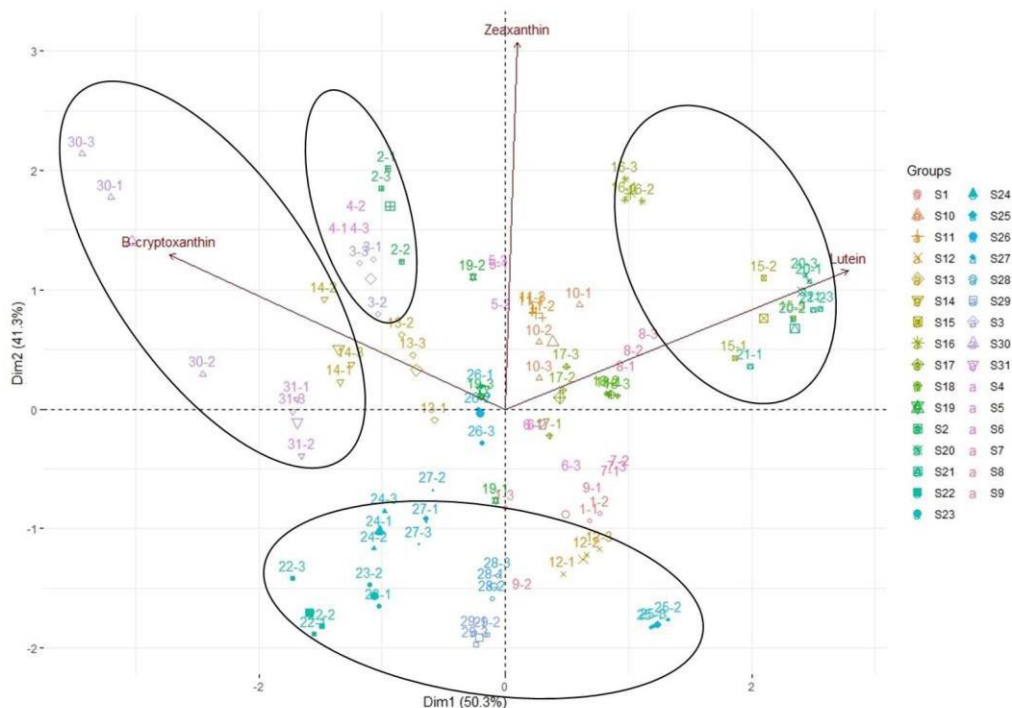
S26	3.16 ± 0.15	1.80 ± 0.21	0.86 ± 0.05	<LOQ	5.82 ± 0.42
S27	1.17 ± 0.22	1.23 ± 0.22	0.68 ± 0.03	<LOQ	3.07 ± 0.45
S28	2.57 ± 0.16	0.44 ± 0.08	0.54 ± 0.04	<LOQ	3.55 ± 0.26
S29	1.33 ± 0.09	0.31 ± 0.05	0.28 ± 0.03	<LOQ	1.92 ± 0.11
S30	<LOQ	2.83 ± 0.80	2.68 ± 0.51	<LOQ	5.5 ± 1.31
S31	0.56 ± 0.22	1.73 ± 0.20	1.52 ± 0.09	<LOQ	3.81 ± 0.5

259 Values are expressed as means ± standard deviation using three biological replicates. <LOQ means below the
 260 limit of quantification (3.25 µg.mL⁻¹). Colors reflect the groups reported in PCA figure 1: very light gray = high
 261 ratio lutein/zeaxanthin; light gray = ratio lutein/zeaxanthin close to 1; dark gray = high lutein concentration;
 262 very dark gray = high ratio lutein/zeaxanthin. Bold lines highlight the genotypes selected for extraction of crude
 263 extracts of carotenoids.

264

265 The S12, S22, S23, S24, S25, S28 and S29 genotypes constitute the last group (colored in very
 266 dark gray) which is characterized by low carotenoid concentrations (between 2 and 5 µg.g⁻¹)
 267 and a high lutein/zeaxanthin ratio (ranging from 3 to 6). We further investigated the effect of
 268 carotenoid crude extracts obtained from a set of ten genotypes on the fungal growth and
 269 production of TCTB by *F. graminearum* CBS 185.32. To account for carotenoid profile
 270 variability, eight genotypes were selected within the four previously described groups and two
 271 genotypes with medium profile (S17 and S18) (Table 2).

272



273

274 **Figure1.** Principal component analysis merging score and loading plots for carotenoids in maize kernels of 31
 275 inbred lines. The ellipses represent the four groups distinguishing the genotypes as a function of their total
 276 carotenoid composition.

277

278 **Effect of carotenoid crude extracts on *F. graminearum* CBS 185.32 growth and TCTB**
 279 **production**

280 Crude extracts prepared for this study (see materials and methods) are reported in Table 3.

281 The homogeneity of carotenoids concentration between the 600mg and 240g extractions was

282 verified. When liquid cultures inoculated with *F. graminearum* were supplemented with

283 carotenoid crude extracts, modifications in fungal biomass and TCTB production were

284 observed (Figure 2). In the presence of crude extracts from S4, S16 and S25 genotypes, a

285 statistically significant increase in mycelium biomass can be observed after 12 days of culture

286 in comparison to control (Figure 2A). Regarding mycotoxin yields, DON and 15ADON were the
 287 major compounds produced by *F. graminearum* CBS 185.32 strain in all tested conditions.
 288 Since the DON/15ADON ratio was not significantly affected by the treatments (data not
 289 shown), the sum DON + 15ADON was used to express the amount of TCTB produced. With the
 290 exception of S20 crude extract, all carotenoid extracts led to a significant inhibition of TCTB
 291 accumulation in 12 day-old cultures (Figure 2B). Two extracts, S14 and S17, were characterized
 292 by a remarkable inhibitory activity, leading to reduction percentages up to 58 and 63%,
 293 respectively. For other extracts, reduction percentages ranged from 30 to 40 %.

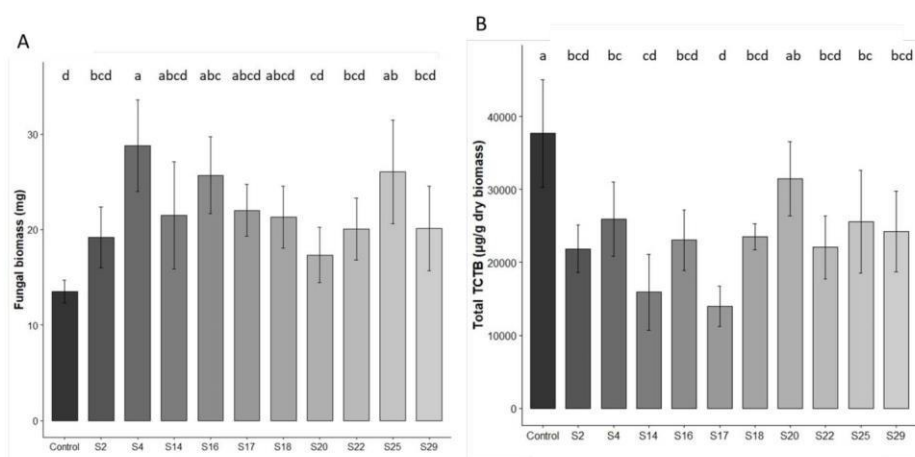
294 **Table 3.** Carotenoid characterization of maize extracts obtained from 240 g dry powder used
 295 for tests on *F. graminearum* growth and TCTB production^a

Sample	Lutein	Zeaxanthin	β -cryptoxanthin	Sum of carotenoids
S2	1.57 (0.012)	1.49 (0.012)	1.2 (0.010)	4.26 (0.034)
S4	2.59 (0.020)	1.74 (0.014)	2.3 (0.019)	6.64 (0.053)
S14	1.58 (0.013)	1.42 (0.011)	2.5 (0.020)	5.50 (0.044)
S16	5.23 (0.041)	3.1 (0.025)	1.37 (0.011)	9.70 (0.077)
S17	2.08 (0.016)	2.31 (0.018)	0.54 (0.004)	4.94 (0.039)
S18	3.75 (0.030)	1.59 (0.013)	0.68 (0.006)	6.02 (0.048)
S20	5.16 (0.041)	1.09 (0.009)	0.68 (0.006)	6.92 (0.055)
S22	2.86 (0.023)	2 (0.016)	1.91 (0.016)	6.76 (0.054)
S25	4.3 (0.034)	1.1 (0.009)	0.22 (0.002)	5.62 (0.045)
S29	2.74 (0.021)	1.65 (0.013)	0.35 (0.003)	4.74 (0.038)

296 ^a All carotenoids are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry matter. Values between parentheses represent the final
 297 concentration in mM of carotenoids in treated MS-glucose liquid medium.

298 The occurrence of correlations between variables associated with carotenoid composition of
 299 the extracts (total carotenoids, individual carotenoid, and ratio lutein/zeaxanthin) and
 300 bioactivity data (fungal biomass and mycotoxin yield) was investigated. The obtained
 301 Pearson's product-moment correlation coefficients are reported Table 4. Significant positive

302 correlations between both zeaxanthin and lutein and dried biomass ($r = 0.42$, $r = 0.30$; $p = 0.01$
 303 and $p = 0.05$ respectively) on one hand, and a negative correlation between zeaxanthin and
 304 TCTB yields ($r = -0.51$, $p < 0.01$) on the other hand, were observed. This observation may
 305 suggest that zeaxanthin could be a key contributor to the overall bioactivity of the tested
 306 carotenoid crude extracts, notably regarding their TCTB inhibitory properties.



307

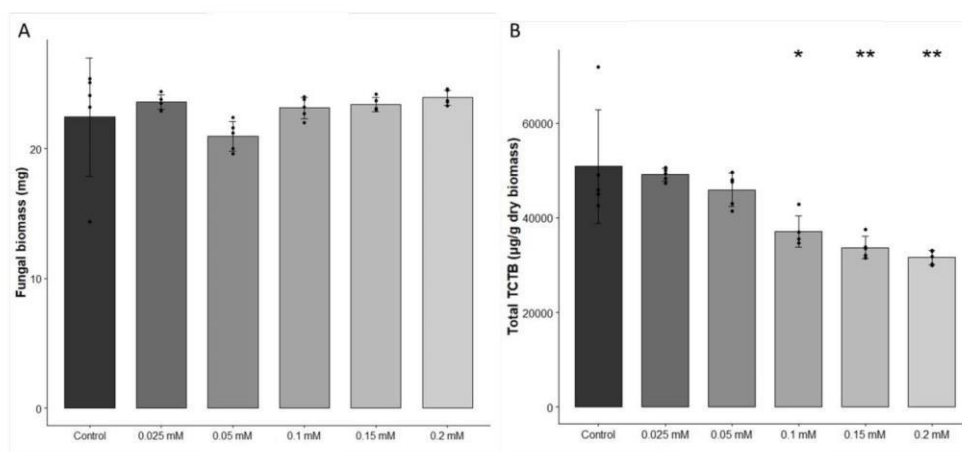
308 **Figure 2.** Effect of maize carotenoid crude extracts on fungal growth (A) and DON + 15ADON production by *F.*
 309 *graminearum* (B). Differences between control and tested carotenoid extract in terms of fungal biomass and
 310 TCTB were determined with multiple comparisons using the Tukey test. Different letters indicate significant
 311 differences ($p < 0.05$). Values are expressed as means \pm standard deviation using five biological replicates.
 312

	Dry biomass	Toxins
Lutein	0.30*	0.05
Zeaxanthin	0.42**	-0.51***
β -cryptoxanthin	0.30*	-0.34*
Total carotenoids	0.47***	-0.27*
Lutein/Zeaxanthin	0.11	0.21

313 **Table 4.** Pearson's matrix correlation coefficient between carotenoid contents vs. biomass or toxin yields by *F.*
 314 *graminearum*. Stars indicate the statistical significance of the correlation (* $p = 0.05$; ** $p = 0.01$; *** $p < 0.001$).
 315
 316

317 **Effect of pure carotenoid solutions on *F. graminearum* CBS185.32 growth and TCTB**
 318 **production**

319 To assess the contribution of lutein and zeaxanthin to the fungal growth and mycotoxin yield
 320 modulating activities of maize carotenoid crude extracts, *F. graminearum* liquid cultures were
 321 supplemented with pure solutions of both compounds in concentrations ranging from 0.01 to
 322 0.025 mM for zeaxanthin and 0.01 to 0.025 mM for lutein. Regarding lutein, neither fungal
 323 biomass nor mycotoxin yield were affected after 12 days of culture (data not shown).
 324 Regarding zeaxanthin, our results show that none of the tested concentrations significantly
 325 affect fungal biomass (Figure 3A), but concentrations equal to or greater than 0.1 mM lead to
 326 significant inhibitions of DON+15ADON production (Figure 3B). After 12 days of cultures, TCTB
 327 yields were reduced by nearly 27, 34 and 38%, with zeaxanthin supplemented at 0.1, 0.15 and
 328 0.2 mM, respectively (Figure 3B).



329

330 **Figure 3.** Effect of zeaxanthin at different concentrations on fungal growth (A) and DON + 15ADON production
 331 by *F. graminearum* (B). Stars * ($p = 0.05$) and ** ($p = 0.01$) indicate significant differences when compared with
 332 control (pairwise Wilcoxon test, control *versus* treated). Values are expressed as means \pm standard deviation
 333 using five biological replicates.

334

335

336 **Effect of zeaxanthin on the expression of key TCTB biosynthetic genes and genes associated**

337 **with oxidative stress response**

338 To further investigate the mechanism by which zeaxanthin can affect the production of TCTB
 339 and impact oxidative metabolism of *F. graminearum*, the expression of key biosynthetic genes
 340 (*Tri 4*, *Tri 5*, *Tri 6* and *Tri 12*) and of genes involved in redox homeostasis system (catalase,
 341 peroxidase, superoxide dismutase and lipoxygenase) were analyzed (Table 1). Expression of
 342 the targeted genes was compared from *F. graminearum* CBS185.32 cultivated in liquid media
 343 supplemented or not with 0.1 mM zeaxanthin. This concentration corresponds to the first
 344 concentration with effect on toxin production on tests with different zeaxanthin
 345 concentrations. As reported in Table 4, fungal growth was slightly reduced by the zeaxanthin
 346 treatment at early stages of development but this difference was no longer observed at late
 347 stages of development. The production of DON+15ADON was first quantified at day 5 and
 348 reach an amount close to 7971 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ at the end of control cultures. The inhibitory effect
 349 induced by zeaxanthin supplementation was observed at day 7 and day 14 but was statistically
 350 significant only at day 14.

351 **Table 4.** Kinetics of fungal growth and DON + 15ADON production by *F. graminearum* CBS
 352 185.32 supplemented or not with zeaxanthin 0.1 mM.

days	Mycelium biomass (mg)		DON+15ADON ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry matter)	
	Control	Zeaxanthin	Control	Zeaxanthin
3	3.1 \pm 0.0	1.5 \pm 0.5***	ND	ND
5	14.6 \pm 1.7	13.6 \pm 0.0***	7971 \pm 2277	9368 \pm 1595
7	27.6 \pm 0.8	28.5 \pm 0.7	19805 \pm 3230	16720 \pm 1040
14	27.7 \pm 0.9	30.2 \pm 1.0	62184 \pm 3960	50010 \pm 4112**

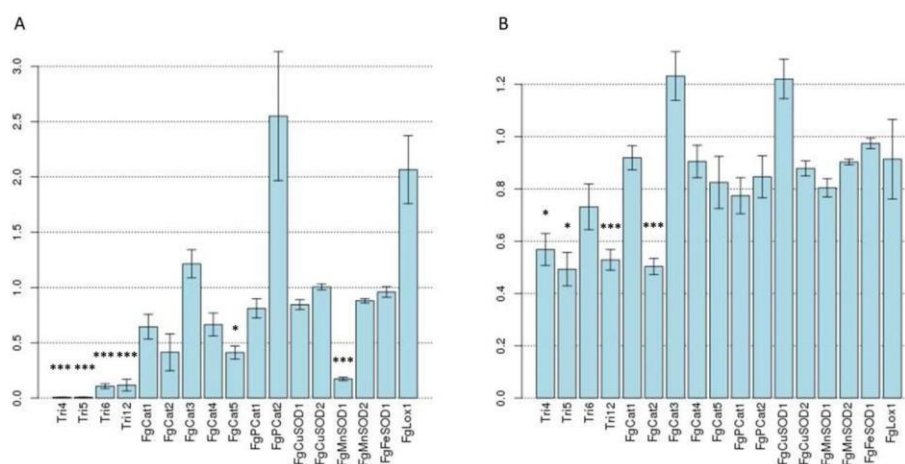
353 Stars** ($p = 0.01$) and *** ($p < 0.001$) indicate significant differences when compared with control (pairwise
 354 Wilcoxon test, control versus treated). Values are expressed as means \pm standard deviation using five biological
 355 replicates. ND – not detected.

357 Gene expression levels of target genes (*Tri* genes and genes associated with redox
 358 homeostasis) were measured at days 3 and 5 (Figure 4A and 4B), *i.e* when TCTB start to
 359 accumulate in broths in our conditions, using those of the *Citrate Synthase* and *H3* genes as

360 references (see materials and methods). Expression values are expressed relative to control
361 condition (Figure 4). Our data evidence a significant downregulation of all studied *Tri* genes
362 that was more important at day 3 than at day 5. Indeed, at day 3, the significant decrease of
363 the expression levels of genes reached more than 99% for *Tri4* and *Tri5* and around 90% for
364 *Tri6* and *Tri12*; while at day 5, these reduction factors were close to 50% for *Tri4*, *Tri5* and
365 *Tri12* and of 30% (but not statistically significant) for *Tri6*. These data suggest that the decrease
366 in TCTB production observed in zeaxanthin-treated cultures could be ascribed to a decrease
367 or a delay in the levels of biosynthetic gene expression. Looking at the expression of genes
368 implicated in redox homeostasis system, results reported in Figure 4A clearly demonstrate the
369 occurrence of a transcriptional control for some targeted genes induced by zeaxanthin
370 supplementation. There is a tendency at the two days observed of a down-regulation of *tri*
371 genes and most of the genes implicated in the redox homeostasis system.

372 At day 3, a significant downregulation of *FgCat5* (FGRAMPH1_01G18533) and *FgMnSOD1*
373 (FGRAMPH1_01G04949) of respectively 60 and 80% was evidenced, and a downregulation of
374 *FgCat1* (FGRAMPH1_01G22571), *FgCat2* (FGRAMPH1_01G11527) and *FgCat4*
375 (FGRAMPH1_01G22669) of respectively 35, 60 and 35% was observed but with no statistical
376 significance ($p = 0.15$, $p = 0.13$ and $p = 0.16$ respectively). In addition, overexpression of
377 *FgPCat2* (FGRAMPH1_01G13859) and *FgLox1* (FGRAMPH1_01G05341) of 250 and 200%
378 respectively was evidenced, but with no statistical significance ($p = 0.07$ and $p = 0.20$
379 respectively). At day 5 only *FgCat2* gene shows a significant reduction of its expression level
380 (close to 50%). These data support the hypothesis of transcriptional perturbations induced by
381 the lipophilic antioxidant zeaxanthin that modulate the oxidative metabolism of *F.*
382 *graminearum*.

383



384

385 **Figure 4.** Expression level of genes in cultures supplemented with zeaxanthin 0.1 mM in 3 day-old (A) and 5 day-
 386 old (B) cultures, in fold-change expression relative to control (solvent). Statistical significance was measured with
 387 pairwise t-test with a pooled standard deviation using SAT-qPCR²² (*: p=0.05; **: p=0.01; ***: p<0.001; error
 388 bars correspond to means \pm standard errors).

389 Discussion

390 In the present study, we demonstrated that extracts of carotenoids naturally occurring in
 391 maize kernels significantly reduce the production of TCTB when supplied in *in vitro* liquid
 392 media inoculated with *F. graminearum*. This inhibition was evidenced for extracts issued from
 393 ten different genotypes of maize characterized by highly diverse carotenoid content and
 394 composition. The occurrence of a such diversity in carotenoid profiles between genotypes of
 395 yellow maize was revealed in our study by considering a set of more than 30 inbred lines
 396 cultivated in the same agroclimatic environment. Although the comparison with previous
 397 reports can be difficult (different extraction and analytical methods, different genotypes and
 398 locations of cultivation), our data were in general agreement with the published scientific
 399 knowledge. Extremely variable contents in total carotenoids, as observed in our study, were
 400 also described by Ortiz-Monasterio et al.²³ and Melendez-Martinez et al.²⁴ and the range of
 401 concentrations we determined (between 1 and 12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) was very close to the data provided

402 by Picot et al.²⁰ and in the lower range of the values more recently described by Trono et al.²⁵
403 and Zurak et al.²⁶. Consistent with literature data^{24,25}, zeaxanthin and lutein were the major
404 compounds we quantified while β -cryptoxanthin was detected in lower amounts and only
405 traces of β -carotene were observed. Carotenoid profiles were highly variable between
406 genotypes even if lutein was the predominant compound for most of the genotypes
407 considered in the present study; such a variability in carotenoid profiles of yellow maize has
408 been broadly investigated and its genetic origin recently documented²⁷.

409 To our knowledge, the present study is the first one describing the capacity of carotenoids
410 extracted from maize kernels and even of pure carotenoid solutions to inhibit the production
411 of TCTB by *F. graminearum*. Indeed, previously published studies have mainly focused on the
412 modulation of the production of aflatoxin and ochratoxin by *Aspergillus species* and
413 considered carotenoid extracts from *capsicum*^{19,28} or pure solutions of β -carotene, lutein, and
414 zeaxanthin¹⁷. One of the few studies involving toxigenic *Fusarium* species has been conducted
415 by Picot et al.²⁰. According to the previous study, concentrations of lutein close to physiological
416 levels occurring in yellow maize induced a reduction in fumonisin production by *F.*
417 *proliferatum*. According to our study, as suggested by the Pearson's correlation matrix built
418 with variables related to the bioactivity of crude extracts and to their carotenoid composition
419 (Table 4), the potential of an extract to inhibit the production of DON + 15ADON appeared as
420 more correlated to its concentration in zeaxanthin than to its total carotenoid content. Thus,
421 samples characterized by a ratio lutein/zeaxanthin lower than 1 (S14 and S17) were the most
422 efficient to reduce TCTB. This result was supported by the demonstrated inhibitory potential
423 of zeaxanthin and the lack of effect of lutein. However, the minimal inhibitory concentration
424 of zeaxanthin was largely higher (approximately 10 times) than the concentration
425 supplemented in liquid broths treated by crude extracts. Overall, the aforementioned data

426 allow to raise two hypotheses: (1) crude extracts contain additional inhibitory compounds
427 than those characterized in our study, (2) the bioactivity of zeaxanthin is increased due to the
428 occurrence of synergistic effects with other carotenoids or other undetermined compounds
429 present in the crude extracts.

430 According to our results (Figure 3), the inhibition of DON + 15ADON yield caused by zeaxanthin
431 could occur while *F. graminearum* growth was not affected. The existence of a regulatory
432 mechanism that specifically targets the production of TCTB was corroborated by the drastic
433 reduction of the expression of DON biosynthetic genes induced by exogenous Zeaxanthin. This
434 downregulation was evidenced for four genes belonging to the core *tri5* cluster and
435 acknowledged for their key role in the biosynthetic pathway²: *tri5* (99% at day 3, 50% at day
436 5) that encodes the trichodiene synthase (catalyzing the cyclization of farnesyl pyrophosphate
437 into trichodiene), *tri4* (99% at day 3, 45% at day 5) that encodes a multifunctional CYP58 family
438 cytochrome P450 monooxygenase involved in DON skeleton synthesis, *tri6* (90% at day 3) that
439 encodes a zinc finger-type transcription factor and *tri12* (90% at day 3, 50% at day 5) encoding
440 a transmembrane transporter. A comparable transcriptional down-regulation of DON
441 biosynthetic genes has been previously reported for other plant natural compounds and more
442 particularly for various phenylpropanoids. For instance, the efficiency of phenolic acids to
443 reduce the biosynthesis of TCTB has been partially ascribed to a decrease in the expression of
444 several *tri* genes^{10,21,29}. Other phenylpropanoids including different flavonoids (apigenin,
445 luteolin, kaempferol, quercetin, and naringenin)³⁰ or lignans (magnolol, pinoselin, and
446 secoisolariciresinol)^{29,31} were also reported as capable of negatively affecting the expression
447 of *tri* genes. One can also mention the recent study of Wang et al.³² who implemented a
448 RNAseq transcriptomic study to decipher the effect of thymol, a phenolic monoterpene, and
449 evidenced a down regulation of most of the *tri* genes. However, the mechanisms by which

450 phenylpropanoids or carotenoids may interact with the transcriptional machinery or the
451 signaling pathways and *in fine* modulate the expression of DON biosynthetic genes remains
452 hitherto unelucidated. One frequently raised hypothesis is related to the antioxidant
453 properties of plant secondary metabolites and their capacity to scavenge various ROS; this
454 capacity has been widely documented for phenylpropanoids but also for carotenoids¹⁵.
455 Indeed, there is converging evidence indicating that the redox balance is one of the most
456 crucial factors for the regulation of DON biosynthesis and that exposure to ROS can increase
457 the expression of *tri* genes and stimulate the production of DON^{16,33,34}. Here, by comparing
458 the expression of genes known for their key role in maintaining redox balance in fungi
459 between control and zeaxanthin-treated cultures, we showed that exogenous zeaxanthin
460 triggered modifications in the antioxidant defense system in *F. graminearum*. Notably, a
461 significant modification of the expression of some catalase genes was evidenced. Catalase that
462 catalyzes the decomposition of H₂O₂ to water and oxygen is a key actor of ROS detoxification.
463 Among the seven genes coding for a putative catalase considered in the present study, three
464 were significantly affected by the zeaxanthin treatment: two genes coding for a putative
465 monofunctional catalase were significantly down-regulated (*FgCat5* at day 3 by 60% and
466 *FgCat2* at day 5 by 50%), while one gene coding for a bifunctional heme-containing catalase,
467 namely a catalase-peroxidase (*FgPCat2*) was strongly up-regulated at day 3 (250% compared
468 to control condition). A reduced expression of *FgCat2* and *FgCat5* induced by environmental
469 changes has previously been evidenced. *FgCat2* reported as a peroxisomal catalase³⁴ was
470 shown to be down-regulated when *F. graminearum* was exposed to Bacillomycin D produced
471 by *Bacillus amyloliquefaciens*³⁵. Regarding *FgCat5*, its down-regulation has been described by
472 Lee et al.³⁶ who have studied the transcriptional response of *F. graminearum* to infection by
473 various mycoviruses. However, according to Lee et al.³⁷, *FgCat2* and *FgCat5* play a minor role

474 in *F. graminearum* stress oxidative response compared to *FgPCat2*. Actually, when using
475 deletion mutants for a large set of putative catalase and peroxidase genes harbored in the
476 genome of *F. graminearum*, the previous authors observed a significantly altered sensitivity
477 to oxidative stress only for four deletion mutants including the knockout mutants for *FgPCat1*
478 and *FgPCat2* and two mutants related to two peroxiredoxins. Besides, Lee et al.³⁷ and more
479 recently, Guo et al.³⁸, have demonstrated that deletion mutants of *FgPCat2* exhibited reduced
480 virulence in wheat associated with elevated ROS surrounding fungal hyphae, and increased
481 trichothecene production compared with those of the wild-type strain and have suggested
482 that *FgPCat2* may significantly contribute to the interaction between *F. graminearum* and
483 wheat. Our data that have shown a reduced accumulation of DON+15ADON associated with
484 an up-regulation of *FgPCat2* in zeaxanthin-treated cultures are in accordance with the
485 aforementioned studies. In addition to a transcriptional control of catalase genes,
486 supplementation with zeaxanthin was also shown to lead to a significant down-expression of
487 *FgMnSOD1* (20 % of control expression level). Superoxide dismutase that catalyze the
488 decomposition of superoxide anion radical into hydrogen peroxide and molecular oxygen are
489 frequently described as the first line of defense against ROS used by fungi. The key role
490 *FgMnSOD1* could play in *F. graminearum* response to oxidative stress in *in vitro* conditions
491 and its potential interconnection with the production of TCTB was previously reported by
492 Montibus et al.³⁴ and further supported by Furukawa et al.³⁹. Besides, *FgMnSOD1* was also
493 suggested to contribute to *F. graminearum* virulence by Yao et al.⁴⁰ who have described its
494 high expression in branching hyphae and invasive hyphae of *F. graminearum* at the biotrophic
495 stage during wheat infection. Lastly, our data have evidenced that exogenous zeaxanthin
496 might induce an up-regulation of 200% (the high upregulation observed at day 3 was however
497 not statistically significant in our experiment) of a gene putatively coding for a 13S

498 lipoxygenase (*FgLOX1*) that catalyzes the oxidation of linoleic acid and generates the 13S-
499 hydroperoxide. According to Teder et al.⁴¹, *FgLOX1* might be involved in jasmonate
500 biosynthesis in *F. graminearum*; production of fungal jasmonates is supposed as detrimental
501 to plants due to overstimulation of plant jasmonate receptors⁴².

502 Altogether our data that have demonstrated the capacity of carotenoids occurring in
503 maize to inhibit the production of DON + 15ADON by *F. graminearum* but also the ability of
504 zeaxanthin to modulate the expression of key genes involved in DON biosynthetic pathway
505 and in fungal redox homeostasis strongly support the hypothesis of a contribution of
506 carotenoids to maize tolerance to *F. graminearum*. They are consistent with previously
507 published studies that have suggested a link between the carotenoid composition of plants
508 and their susceptibility to toxigenic fungal infection. For instance, the report of Boba et al.⁴³,
509 based on the use of transgenic flax overproducing carotenoids, has concluded that the total
510 amount of carotenoids (rather than the content of any particular compound) might be a key
511 factor of resistance to the DON producing *Fusarium culmorum* species. More recently,
512 Suwarno et al.⁴⁴ have shown that maize hybrids with high amounts of carotenoids were less
513 contaminated by aflatoxins. Our data are therefore first insights providing evidence that
514 carotenoid composition of maize could be an interesting phenotyping trait to be integrated in
515 breeding pipelines aiming at improving maize resistance to DON contamination.

516 **Author Information**

517 **Corresponding author**

518 Florence Richard-Forget - INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 33140
519 Villenave d'Ornon, France.

520 Email: Florence.forget@inrae.fr

521 **Authors**

522 Jean-Marie Savignac- INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 33140 Villenave
523 d'Ornon, France; Syngenta France SAS, 32220 Lombez, France

524 Vessela Atanasova- INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 33140 Villenave
525 d'Ornon, France.

526 Sylvain Chereau- INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 33140 Villenave
527 d'Ornon, France.

528 Christine Ducos- INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 33140 Villenave
529 d'Ornon, France.

530 Nathalie Gallegos- INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 33140 Villenave
531 d'Ornon, France.

532 Véronique ORTEGA- Syngenta France SAS, 32220 Lombez, France

533 Nadia Ponts- INRAE, UR 1264 Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 33140 Villenave d'Ornon,
534 France.

535 Funding

536 This research was supported by a collaborative project involving INRAE and Syngenta (grant agreement
537 22001389-00004520)

538 Notes

539 The authors declare no conflict of interest

540 Abbreviations

541 GER, Gibberella ear rot; F. graminearum, Fusarium graminearum; TCTB, Type B
542 trichothecenes; DON, deoxynivalenol; ADON, acetyl-deoxynivalenol; PCA, principal
543 component analysis; H3, Histone 3; Cat, catalase; SOD, superoxide dismutase; LOX,
544 lipoxygenases; ROS, reactive oxygen species; LC-DAD, Liquid Chromatography – Photodiode
545 Array Detector; BHT, Butylated Hydroxytoluene; MeOH, Methanol.

546 References

- 547 (1) Ferrigo, D.; Raiola, A.; Causin, R. Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation,
548 Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Mol. Basel Switz.* **2016**, *21*
549 (5), 627.
- 550 (2) Chen, Y.; Kistler, H. C.; Ma, Z. *Fusarium Graminearum* Trichothecene Mycotoxins:
551 Biosynthesis, Regulation, and Management. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2019**, *57* (1), 15–
552 39.
- 553 (3) Pestka, J. J. Deoxynivalenol: Mechanisms of Action, Human Exposure, and Toxicological
554 Relevance. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84* (9), 663–679.
- 555 (4) Perrone, G.; Ferrara, M.; Medina, A.; Pascale, M.; Magan, N. Toxigenic Fungi and
556 Mycotoxins in a Climate Change Scenario: Ecology, Genomics, Distribution, Prediction
557 and Prevention of the Risk. *Microorganisms* **2020**, *8* (10).
- 558 (5) Leslie, J. F.; Moretti, A.; Mesterházy, Á.; Ameye, M.; Audenaert, K.; Singh, P. K.; Richard-
559 Forget, F.; Chulze, S. N.; Ponte, E. M. D.; Chala, A.; Battilani, P.; Logrieco, A. F. Key
560 Global Actions for Mycotoxin Management in Wheat and Other Small Grains. *Toxins*
561 **2021**, *13* (10), 725.

- 562 (6) Bernardo, R. Molecular Markers and Selection for Complex Traits in Plants: Learning
563 from the Last 20 Years. *Crop Sci.* **2008**, *48* (5), 1649–1664.
- 564 (7) Gauthier, L.; Atanasova-Penichon, V.; Chéreau, S.; Richard-Forget, F. Metabolomics to
565 Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium Graminearum* and
566 Deoxynivalenol Accumulation. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 24839–24872.
- 567 (8) Ponts, N.; Pinson-Gadais, L.; Boutigny, A.-L.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Cinnamic-
568 Derived Acids Significantly Affect *Fusarium Graminearum* Growth and In Vitro Synthesis
569 of Type B Trichothecenes. *Phytopathology*® **2011**, *101* (8), 929–934.
- 570 (9) Atanasova-Penichon, V.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Antioxidant Secondary
571 Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to *Fusarium* and Mycotoxin
572 Accumulation. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*.
- 573 (10) Kulik, T.; Stuper-Szablewska, K.; Bilska, K.; Buśko, M.; Ostrowska-Kołodziejczak, A.;
574 Załuski, D.; Perkowski, J. Trans-Cinnamic and Chlorogenic Acids Affect the Secondary
575 Metabolic Profiles and Ergosterol Biosynthesis by *Fusarium Culmorum* and F.
576 *Graminearum* Sensu Stricto. *Toxins* **2017**, *9* (7), E198.
- 577 (11) Kean, E. G.; Ejeta, G.; Hamaker, B. R.; Ferruzzi, M. G. Characterization of Carotenoid
578 Pigments in Mature and Developing Kernels of Selected Yellow-Endosperm Sorghum
579 Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (7), 2619–2626.
- 580 (12) Maurer, M. M.; Mein, J. R.; Chaudhuri, S. K.; Constant, H. L. An Improved UHPLC-UV
581 Method for Separation and Quantification of Carotenoids in Vegetable Crops. *Food*
582 *Chem.* **2014**, *165*, 475–482.
- 583 (13) Sun, X.; Ma, L.; Lux, P. E.; Wang, X.; Stuetz, W.; Frank, J.; Liang, J. The Distribution of
584 Phosphorus, Carotenoids and Tocochromanols in Grains of Four Chinese Maize (*Zea*
585 *Mays* L.) Varieties. *Food Chem.* **2022**, *367*, 130725.
- 586 (14) Fàbregas, N.; Fernie, A. R. The Reliance of Phytohormone Biosynthesis on Primary
587 Metabolite Precursors. *J. Plant Physiol.* **2022**, *268*, 153589.
- 588 (15) Dumanović, J.; Nepovimova, E.; Natić, M.; Kuča, K.; Jačević, V. The Significance of
589 Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise
590 Overview. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, 552969.
- 591 (16) Montibus, M.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C.; Ponts, N. Coupling of
592 Transcriptional Response to Oxidative Stress and Secondary Metabolism Regulation in
593 Filamentous Fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *41* (3), 295–308.
- 594 (17) Norton, R. A. Effect of Carotenoids on Aflatoxin B(1) Synthesis by *Aspergillus Flavus*.
595 *Phytopathology* **1997**, *87* (8), 814–821.
- 596 (18) Wicklow, D. T.; Norton, R. A.; McAlpin, C. E. β -Carotene Inhibition of Aflatoxin
597 Biosynthesis among *Aspergillus Flavus* Genotypes from Illinois Corn. *Mycoscience* **1998**,
598 *39* (2), 167–172.
- 599 (19) Santos, L.; Kasper, R.; Gil-Serna, J.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A. J. Effect of Capsicum
600 Carotenoids on Growth and Ochratoxin A Production by Chilli and Paprika *Aspergillus*
601 *Spp.* Isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *142* (3), 354–359.
- 602 (20) Picot, A.; Atanasova-Pénichon, V.; Pons, S.; Marchegay, G.; Barreau, C.; Pinson-Gadais,
603 L.; Roucolle, J.; Daveau, F.; Caron, D.; Richard-Forget, F. Maize Kernel Antioxidants and
604 Their Potential Involvement in *Fusarium* Ear Rot Resistance. *J. Agric. Food Chem.* **2013**,
605 *61* (14), 3389–3395.
- 606 (21) Boutigny, A.-L.; Barreau, C.; Atanasova-Penichon, V.; Verdal-Bonnin, M.-N.; Pinson-
607 Gadais, L.; Richard-Forget, F. Ferulic Acid, an Efficient Inhibitor of Type B Trichothecene

- 608 Biosynthesis and Tri Gene Expression in Fusarium Liquid Cultures. *Mycol. Res.* **2009**, *113*
609 (6), 746–753.
- 610 (22) Rancurel, C.; van Tran, T.; Elie, C.; Hilliou, F. SATQPCR: Website for Statistical Analysis of
611 Real-Time Quantitative PCR Data. *Mol. Cell. Probes* **2019**, *46*, 101418.
- 612 (23) Ortiz-Monasterio, J. I.; Palacios-Rojas, N.; Meng, E.; Pixley, K.; Trethowan, R.; Peña, R. J.
613 Enhancing the Mineral and Vitamin Content of Wheat and Maize through Plant
614 Breeding. *J. Cereal Sci.* **2007**, *46* (3), 293–307.
- 615 (24) Meléndez-Martínez, A. J.; Mandić, A. I.; Bantis, F.; Böhm, V.; Borge, G. I. A.; Brnčić, M.;
616 Bysted, A.; Cano, M. P.; Dias, M. G.; Elgersma, A.; Fikselová, M.; García-Alonso, J.;
617 Giuffrida, D.; Gonçalves, V. S. S.; Hornero-Méndez, D.; Kljak, K.; Lavelli, V.; Manganaris,
618 G. A.; Mapelli-Brahm, P.; Marounek, M.; Olmedilla-Alonso, B.; Periago-Castón, M. J.;
619 Pintea, A.; Sheehan, J. J.; Tumbas Šaponjac, V.; Valšíková-Frey, M.; Meulebroek, L. V.;
620 O'Brien, N. A Comprehensive Review on Carotenoids in Foods and Feeds: Status Quo,
621 Applications, Patents, and Research Needs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62* (8), 1999–
622 2049.
- 623 (25) Trono, D. Carotenoids in Cereal Food Crops: Composition and Retention throughout
624 Grain Storage and Food Processing. *Plants* **2019**, *8* (12), 551.
- 625 (26) Zurak, D.; Grbeša, D.; Duvnjak, M.; Kiš, G.; Međimurec, T.; Kljak, K. Carotenoid Content
626 and Bioaccessibility in Commercial Maize Hybrids. *Agriculture* **2021**, *11* (7), 586.
- 627 (27) Diepenbrock, C. H.; Ilut, D. C.; Magallanes-Lundback, M.; Kandianis, C. B.; Lipka, A. E.;
628 Bradbury, P. J.; Holland, J. B.; Hamilton, J. P.; Wooldridge, E.; Vaillancourt, B.; Góngora-
629 Castillo, E.; Wallace, J. G.; Cepela, J.; Mateos-Hernandez, M.; Owens, B. F.; Tiede, T.;
630 Buckler, E. S.; Rocheford, T.; Buell, C. R.; Gore, M. A.; DellaPenna, D. Eleven Biosynthetic
631 Genes Explain the Majority of Natural Variation in Carotenoid Levels in Maize Grain.
632 *Plant Cell* **2021**, *33* (4), 882–900.
- 633 (28) Masood, A.; Dogra, J. v. v.; Jha, A. k. The Influence of Colouring and Pungent Agents of
634 Red Chilli (*Capsicum Annum*) on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus Flavus*.
635 *Let. Appl. Microbiol.* **1994**, *18* (4), 184–186.
- 636 (29) Oufensou, S.; Balmás, V.; Azara, E.; Fabbri, D.; Dettori, M. A.; Schüller, C.; Zehetbauer,
637 F.; Strauss, J.; Delogu, G.; Migheli, Q. Naturally Occurring Phenols Modulate Vegetative
638 Growth and Deoxynivalenol Biosynthesis in *Fusarium Graminearum*. *ACS Omega* **2020**,
639 *5* (45), 29407–29415.
- 640 (30) Bilska, K.; Stuper-Szablewska, K.; Kulik, T.; Buško, M.; Załuski, D.; Jurczak, S.; Perkowski,
641 J. Changes in Phenylpropanoid and Trichothecene Production by *Fusarium Culmorum*
642 and *F. Graminearum* *Sensu Stricto* via Exposure to Flavonoids. *Toxins* **2018**, *10* (3), 110.
- 643 (31) Kulik, T.; Buško, M.; Pszczółkowska, A.; Perkowski, J.; Okorski, A. Plant Lignans Inhibit
644 Growth and Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium Graminearum*. *Let. Appl.*
645 *Microbiol.* **2014**, *59* (1), 99–107.
- 646 (32) Wang, L.-Q.; Wu, K.-T.; Yang, P.; Hou, F.; Rajput, S. A.; Qi, D.-S.; Wang, S.
647 Transcriptomics Reveals the Effect of Thymol on the Growth and Toxin Production of
648 *Fusarium Graminearum*. *Toxins* **2022**, *14* (2), 142.
- 649 (33) Ponts, N.; Pinson-Gadais, L.; Barreau, C.; Richard-Forget, F.; Ouellet, T. Exogenous H₂O₂
650 and Catalase Treatments Interfere with Tri Genes Expression in Liquid Cultures of
651 *Fusarium Graminearum*. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (3), 443–447.
- 652 (34) Montibus, M.; Ducos, C.; Bonnin-Verdal, M.-N.; Bormann, J.; Ponts, N.; Richard-Forget,
653 F.; Barreau, C. The BZIP Transcription Factor Fgap1 Mediates Oxidative Stress Response

- 654 and Trichothecene Biosynthesis But Not Virulence in *Fusarium Graminearum*. *PLOS ONE*
655 **2013**, *8* (12), e83377.
- 656 (35) Gu, Q.; Yang, Y.; Yuan, Q.; Shi, G.; Wu, L.; Lou, Z.; Huo, R.; Wu, H.; Borriss, R.; Gao, X.
657 Bacillomycin D Produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* Is Involved in the Antagonistic
658 Interaction with the Plant-Pathogenic Fungus *Fusarium Graminearum*. *Appl. Environ.*
659 *Microbiol.* **2017**, *83* (19), e01075-17.
- 660 (36) Lee, K.-M.; Cho, W. K.; Yu, J.; Son, M.; Choi, H.; Min, K.; Lee, Y.-W.; Kim, K.-H. A
661 Comparison of Transcriptional Patterns and Mycological Phenotypes Following
662 Infection of *Fusarium Graminearum* by Four Mycoviruses. *PLoS One* **2014**, *9* (6),
663 e100989.
- 664 (37) Lee, Y.; Son, H.; Shin, J. Y.; Choi, G. J.; Lee, Y.-W. Genome-Wide Functional
665 Characterization of Putative Peroxidases in the Head Blight Fungus *Fusarium*
666 *Graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19* (3), 715–730.
- 667 (38) Guo, Y.; Yao, S.; Yuan, T.; Wang, Y.; Zhang, D.; Tang, W. The Spatiotemporal Control of
668 KatG2 Catalase-Peroxidase Contributes to the Invasiveness of *Fusarium Graminearum*
669 in Host Plants. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20* (5), 685–700.
- 670 (39) Furukawa, T.; Yoshinari, T.; Sakuda, S. Intracellular Superoxide Level Controlled by
671 Manganese Superoxide Dismutases Affects Trichothecene Production in *Fusarium*
672 *Graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364* (21).
- 673 (40) Yao, S.-H.; Guo, Y.; Wang, Y.-Z.; Zhang, D.; Xu, L.; Tang, W.-H. A Cytoplasmic Cu-Zn
674 Superoxide Dismutase SOD1 Contributes to Hyphal Growth and Virulence of *Fusarium*
675 *Graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **2016**, *91*, 32–42.
- 676 (41) Teder, T.; Boeglin, W. E.; Schneider, C.; Brash, A. R. A Fungal Catalase Reacts Selectively
677 with the 13S Fatty Acid Hydroperoxide Products of the Adjacent Lipxygenase Gene
678 and Exhibits 13S-Hydroperoxide-Dependent Peroxidase Activity. *Biochim. Biophys. Acta*
679 **2017**, *1862* (7), 706–715.
- 680 (42) Oliw, E. H. Iron and Manganese Lipxygenases of Plant Pathogenic Fungi and Their Role
681 in Biosynthesis of Jasmonates. *Arch. Biochem. Biophys.* **2022**, *722*, 109169.
- 682 (43) Boba, A.; Kulma, A.; Kostyn, K.; Starzycki, M.; Starzycka, E.; Szopa, J. The Influence of
683 Carotenoid Biosynthesis Modification on the *Fusarium Culmorum* and *Fusarium*
684 *Oxysporum* Resistance in Flax. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2011**, *76* (1), 39–47.
- 685 (44) Suwarno, W. B.; Hannok, P.; Palacios-Rojas, N.; Windham, G.; Crossa, J.; Pixley, K. V.
686 Provitamin A Carotenoids in Grain Reduce Aflatoxin Contamination of Maize While
687 Combating Vitamin A Deficiency. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*.
- 688

Chap.3 II) Données complémentaires sur les antioxydants lipophiles non considérés dans l'article

A- Etude de l'effet antifongique et anti-mycotoxine de la lutéine, zéaxanthine, β -cryptoxanthine et β -carotène.

L'article précédemment reporté a essentiellement ciblé l'activité de la zéaxanthine, un des caroténoïdes majoritaires des grains de maïs. En complément, une étude comparative des effets antifongiques et anti-mycotoxines des autres caroténoïdes présents dans les maïs (lutéine qui est aussi un composé majeur, β -cryptoxanthine et β -carotène retrouvés en très faibles quantités) a été menée. La souche *F. graminearum* CBS 185.32 a été utilisée. L'effet d'une supplémentation des milieux de culture avec une concentration de 0.1 mM des composés précédemment cités sur la croissance fongique et la production de TCTB est reporté sur la Figure 1. Les résultats montrent que les caroténoïdes n'affectent pas la biomasse fongique (Figure 1A). Concernant les mycotoxines, les résultats mettent en évidence une inhibition de la production de TCTB induite par les quatre molécules avec des pourcentages de 8, 10, 15 et 30% environ pour la β -cryptoxanthine, la lutéine, le β -carotène et la zéaxanthine, respectivement. Cependant, le test statistique utilisé a montré que les effets d'inhibition observés sont significatifs uniquement pour la zéaxanthine et la β -cryptoxanthine (Figure 1B).

Dans un second temps, la lutéine et le β -carotène ont été testés à plusieurs concentrations allant de 0,025 à 0,2 mM. La β -cryptoxanthine n'a pas été considérée dans cette étude du fait de l'absence de standard commercial à un coût acceptable et de sa faible concentration dans les grains. Concernant la lutéine, les résultats ont montré qu'aux cinq concentrations testées, la lutéine n'affecte ni la croissance ni la production de toxines (résultats non présentés). Pour le β -carotène (Figure 2A), nous avons observé une très légère diminution de la biomasse (statistiquement significative uniquement pour les concentrations de 0.025 et 0.05 mM, avec une réduction moyenne proche de 5% ($p = 0.05$)). Après 12 jours de culture, nos données indiquent une diminution de la production de toxines avec un effet dose en présence de concentrations croissantes de 0.05 à 0.2 mM (Figure 2B). La réduction est de 12, 16, 24 et 22% pour 0.05, 0.1, 0.15 et 0.2 mM respectivement. Cependant, une grande variabilité dans les niveaux de DON+ 15 ADON a été observée et l'inhibition mise en évidence n'est significative que pour la concentration de 0.15 mM ($p = 0.01$).

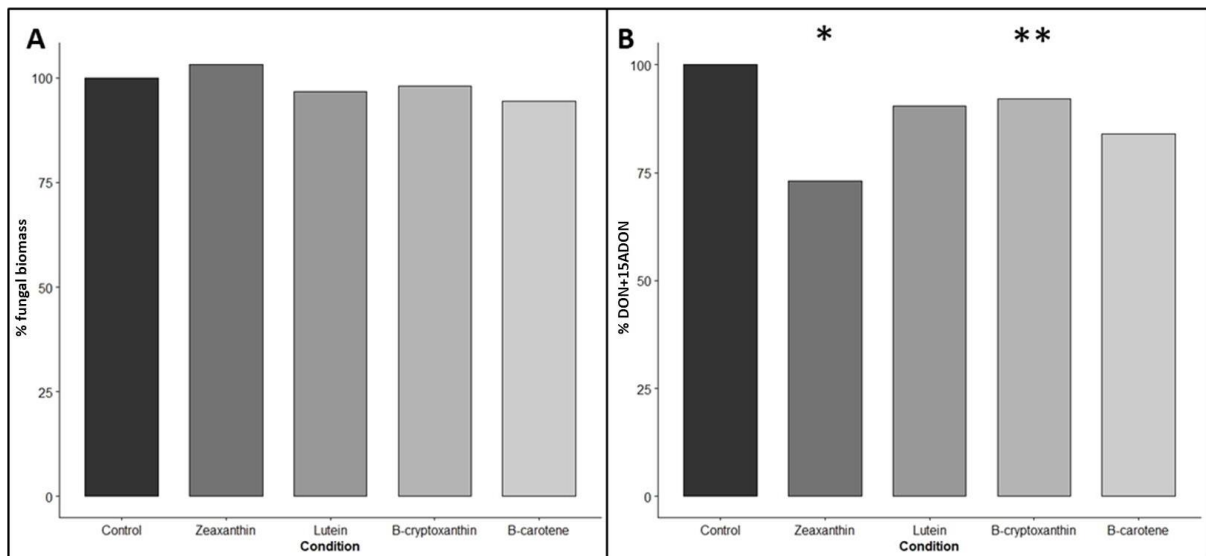


Figure 1. Effet des caroténoïdes à 0,1 mM sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de *F. graminearum* CBS 185.32. Les étoiles* ($p = 0.05$) and ** ($p = 0.01$) indiquent les différences significatives de comparaison avec la condition contrôle (pairwise Wilcoxon test, contrôle *versus* traitement). Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle avec cinq répliques biologiques.

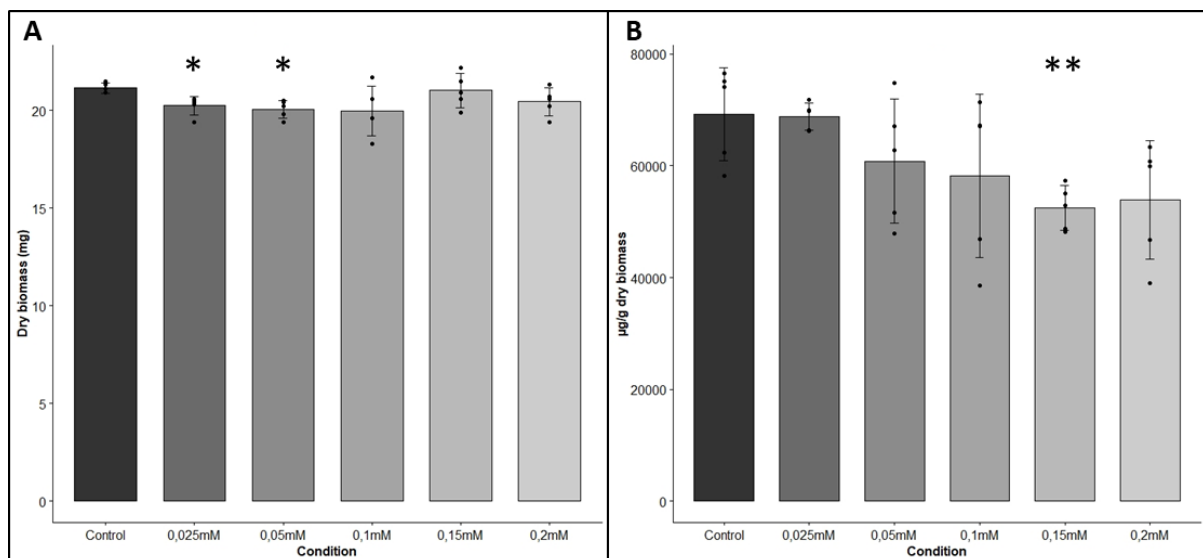


Figure 2. Effet du β -carotène sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de *F. graminearum* CBS 185.32. Les étoiles* ($p = 0.05$) et ** ($p = 0.01$) indiquent les différences significatives de comparaison avec la condition contrôle (pairwise Wilcoxon test, contrôle *versus* traitement). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de cinq répliques biologiques.

Pour approfondir l'investigation des effets de la lutéine et le β -carotène sur le métabolisme de *F. graminearum*, le niveau d'expression de plusieurs gènes de biosynthèse des TCTB (*Tri 4*, *Tri 5*, *Tri 6* et *Tri 12*) et plusieurs gènes impliqués dans la réponse à des modifications de potentiel redox (catalase, peroxidase, superoxide dismutase et lipoxygénase) a été analysé. Ces analyses sont similaires à celles

décrites pour la zéaxanthine dans l'article scientifique précédemment reporté. Dans le Tableau 1 sont décrites les cinétiques de croissance et de production de toxines de la souche *F. graminearum* CBS 185.32 dans les conditions contrôle et traitées avec la lutéine et le β -carotène (0.1 mM). Pour la lutéine aux stades précoces (3 et 5 jours), on observe une réduction significative de la croissance. Nos résultats indiquent aussi une inhibition significative de la production de toxines à 5 et 7 jours. Cependant, en fin de culture, ces effets inhibiteurs ne sont plus retrouvés, en accord avec les données reportées sur la Figure 1. En ce qui concerne les milieux supplémentés avec le β -carotène, la diminution de l'accumulation de DON + 15-ADON n'est significative que pour le jour 14.

Tableau 1. Cinétique de croissance fongique et de production de toxines (DON + 15ADON) par *F. graminearum* CBS 185.32 en présence ou non de lutéine ou de β -carotène à 0.1 mM.

Jours	Biomasses mycéliennes (mg)			DON+15ADON ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ matière sèche)		
	Contrôle	Lutéine	β -carotène	Contrôle	Lutéine	β -carotène
3	3.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.0 ***	3.0 \pm 0.2 **	ND	ND	ND
5	14.6 \pm 1.7	12.1 \pm 0.5 ***	15.6 \pm 0.1 **	7971 \pm 2277	5855 \pm 958 **	6864 \pm 1697
7	27.6 \pm 0.8	26.9 \pm 0.2	27.3 \pm 1.3	19805 \pm 3230	14704 \pm 2101 *	19798 \pm 777
14	27.7 \pm 0.9	28.7 \pm 0.3	28.3 \pm 0.3	62184 \pm 3960	55084 \pm 8642	50158 \pm 4303 **

Les étoiles *(p = 0.05), ** (p = 0.01) et *** (p < 0.001) indiquent les différences significatives en comparaison avec la condition contrôle (pairwise Wilcoxon test, control versus traitement). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type des cinq réplicas biologiques. ND – Non détecté.

Le niveau d'expression des gènes cibles (gènes *Tri* et gènes associés au système du maintien de l'homéostasie redox) a été mesuré à 3 jours. Les gènes *H3* et *citrate synthase* ont été utilisés comme gènes de références. Les niveaux d'expression sont exprimés sous forme de ratio, condition traitée par rapport à la condition contrôle (Figures 3 et 4).

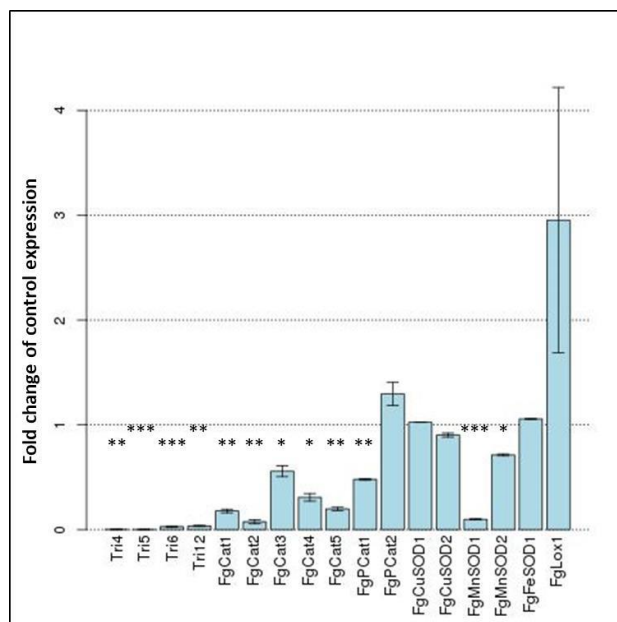


Figure 3. Modulation de l'expression de gènes cibles dans des cultures supplémentées avec 0.1 mM de lutéine, à 3 jours post-inoculation, exprimée en fold-change du niveau d'expression par rapport au contrôle. Les significativités statistiques sont mesurées par un t-test par paires avec l'erreur standard en utilisant SAT-qPCR (Rancurel *et al.* 2019) (*: $p=0.05$; **: $p=0.01$; ***: $p<0.001$; les barres d'erreur correspondent aux moyennes \pm erreur standard).

En ce qui concerne les cultures supplémentées avec la lutéine (Figure 3), nos résultats mettent en évidence une diminution conséquente de l'expression des quatre gènes *Tri* testés. Ces données sont en accord avec l'inhibition de la biosynthèse de DON + 15 ADON précédemment décrite pour les temps 5 et 7 jours. Cette inhibition n'induit cependant qu'un retard dans la cinétique d'accumulation de toxines puisqu'à 14 jours les niveaux entre conditions traitées et contrôle sont similaires. Cet effet initial qui ne perdure pas pourrait s'expliquer par une instabilité chimique (sous l'effet de la lumière ou diminution drastique du pH telle qu'observée dans les milieux MS inoculés par *F. graminearum*) ou dégradation de la lutéine (oxydation chimique en présence de radicaux libres ou enzymatique). Sur la Figure 3, il apparait aussi que plusieurs gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie redox sont affectés dans leur expression la supplémentation par la lutéine. L'expression de la majorité des gènes codant pour des catalases (à l'exception de la catalase peroxydase *FgPCat2*) est significativement réduite par le traitement caroténoïde. Il en est de même pour les deux gènes codant pour des manganèse superoxyde dismutases *FgMnSOD1* et *FgMnSOD2*. Le seul gène pour lequel on observe un contrôle transcriptionnel positif exercé par la lutéine est *FgLox1* qui code pour une lipoxygénase (cette régulation positive n'est cependant pas statistiquement significative).

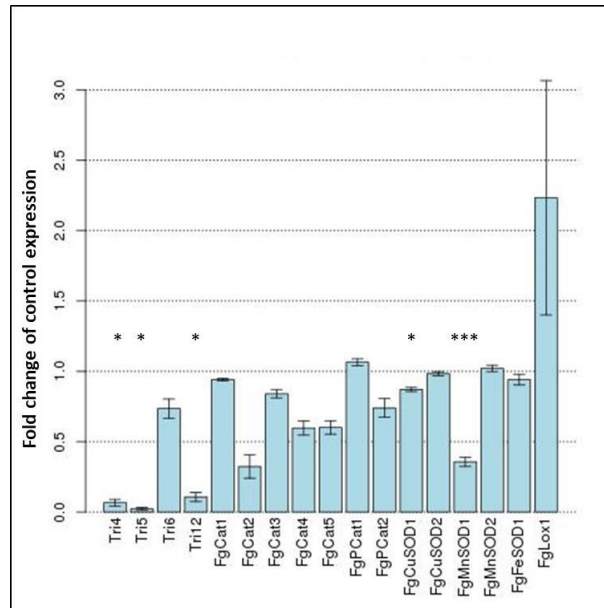


Figure 4. Modulation de l'expression de gènes cibles dans des cultures supplémentées avec 0.1 mM de β -carotène, à 3 jours post-inoculation, exprimée en fold-change du niveau d'expression par rapport au contrôle. Les significativités statistiques sont mesurées par un t-test par paires avec l'erreur standard en utilisant SAT-qPCR (Rancurel *et al.* 2019) (*: $p=0.05$; **: $p=0.01$; ***: $p<0.001$; les barres d'erreur correspondent aux moyennes \pm erreur standard).

Pour les cultures supplémentées avec 0.1 mM de β -carotène (Figure 4), une réduction significative de l'expression des gènes *Tri4*, *Tri5* et *Tri12* est observée. Le β -carotène semble aussi induire une diminution (plus faible et non significative dans notre expérimentation) de l'expression du gène *tri6* qui est un régulateur positif de l'ensemble des gènes *tri*. Ces données suggèrent que la diminution de la production de TCTB observée dans le Tableau 1 pourrait partiellement résulter d'un contrôle transcriptionnel négatif des gènes *tri*. Pour les gènes impliqués dans la réponse à un stress oxydant, les résultats montrent une diminution significative de l'expression des superoxyde dismutases *FgCuSOD1* et *FgMnSOD1*. Similairement à ce qui a été mis en évidence avec la lutéine, le seul gène surexprimé est le gène *FgLox1*.

En combinant les résultats précédemment décrits à ceux centrés autour de l'effet de la zéaxanthine présentés dans l'article soumis à *JAFAC*, il est possible de réaliser un bilan comparé de l'activité des caroténoïdes du maïs vis-à-vis de *F. graminearum*.

- Parmi les quatre caroténoïdes des grains de maïs, la zéaxanthine semble posséder la plus forte capacité à inhiber la biosynthèse de TCTB. Une faible activité inhibitrice est aussi retrouvée avec le β -cryptoxanthine et le β -carotène. La lutéine induit uniquement un retard dans la cinétique de production de DON + 15-ADON. Après 3 jours de culture, l'exposition de *F. graminearum* à la zéaxanthine, la lutéine et le β -carotène conduit à une inhibition de

l'expression de quatre gènes clefs impliqués dans la voie de biosynthèse des TCTB (*tri4*, *tri5*, *tri6* et *tri12*). L'amplitude de ce contrôle transcriptionnel négatif semble plus faible avec le β -carotène.

- Zéaxanthine, lutéine et dans une moindre mesure le β -carotène affectent l'expression de plusieurs gènes de réponse au stress oxydant. Cette régulation n'est pas surprenante compte tenu des propriétés antioxydantes détenues par les caroténoïdes. Selon les données de Müller *et al.* (Müller *et al.* 2011), zéaxanthine et lutéine seraient plus efficaces que le β -carotène pour piéger les radicaux peroxydes. Il serait alors intéressant de suivre les teneurs en ROS dans les milieux de culture pour préciser le lien entre potentiel antioxydant des caroténoïdes et bioactivité. Quel que soit le traitement caroténoïde, deux gènes ont été particulièrement affectés dans leur expression : *FgMnSOD1* et *FgLOX1*. Comme discuté dans l'article soumis à JAFC, les enzymes associées à ces deux gènes sont susceptibles de jouer un rôle clef dans l'interaction entre *F. graminearum* et la plante hôte.

B- Etude de l'effet antifongique et anti-mycotoxine des principaux tocochromanols du maïs

Les standards de α - et γ -tocophérols et tocotrienols ont été achetés chez Extrasynthese (Genay, France). Dans une première étape, la souche *F. graminearum* CBS 185.32 a été inoculée dans des cultures liquides supplémentées avec les tocochromanols les plus représentés dans les grains de maïs matures (α -, et γ -tocophérols et tocotrienols) à une concentration de 0.1 mM. Aucune modulation de la croissance fongique et de la toxinogénèse n'a été observée quel que soit le composé considéré. La gamme de concentrations testées a alors été élargie (de 0 à 0,5 mM) pour les deux tocochromanols majeurs du maïs (α - et γ - tocophérols). Les résultats sont reportés sur les Figures 5 et 6. Nos données indiquent clairement que si la supplémentation par l' α -tocophérol (Figure 5) semble induire une légère augmentation de la biomasse fongique (statistiquement significative) à des concentrations de 0.25 et 0.5 mM ($p = 0.05$) qui sont supérieures aux concentrations physiologiques des grains (cf chapitre 2), aucune modulation significative de la production de toxines n'est observée.

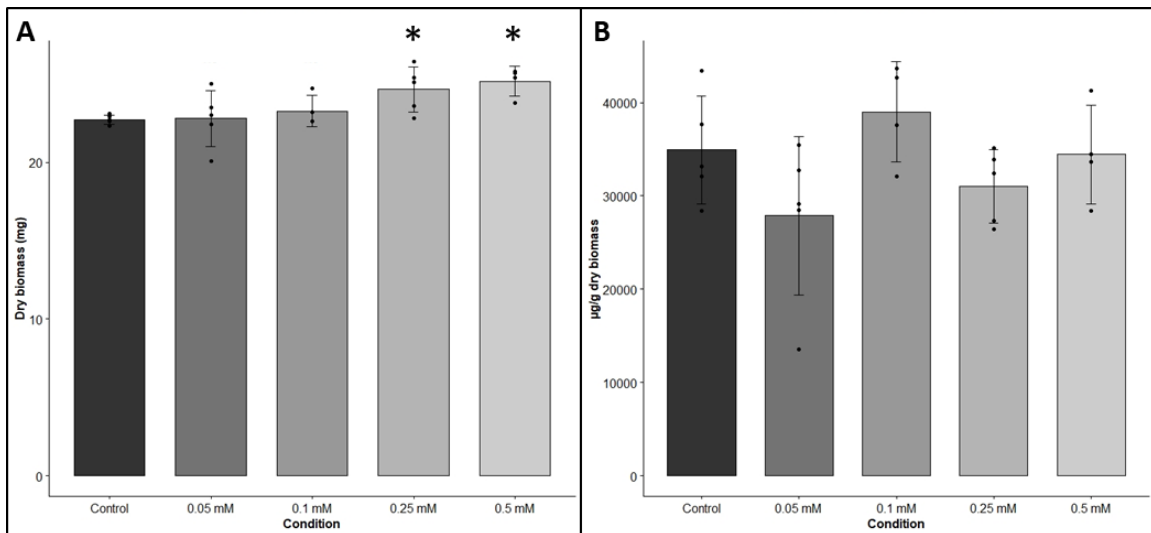


Figure 5. Effet de l' α -tocophérol sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de *F. graminearum* CBS 185.32. Les étoiles* ($p = 0.05$) and ** ($p = 0.01$) indiquent les différences significatives de comparaison avec la condition contrôle (pairwise Wilcoxon test, contrôle *versus* traitement). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de cinq réplicas biologiques.

Quant aux effets d'une supplémentation par le γ -tocophérol, cette dernière n'a conduit à aucune différence significative de biomasse fongique ou de teneur en DON+ ADON et ceci pour toutes les concentrations testées (Figure 6).

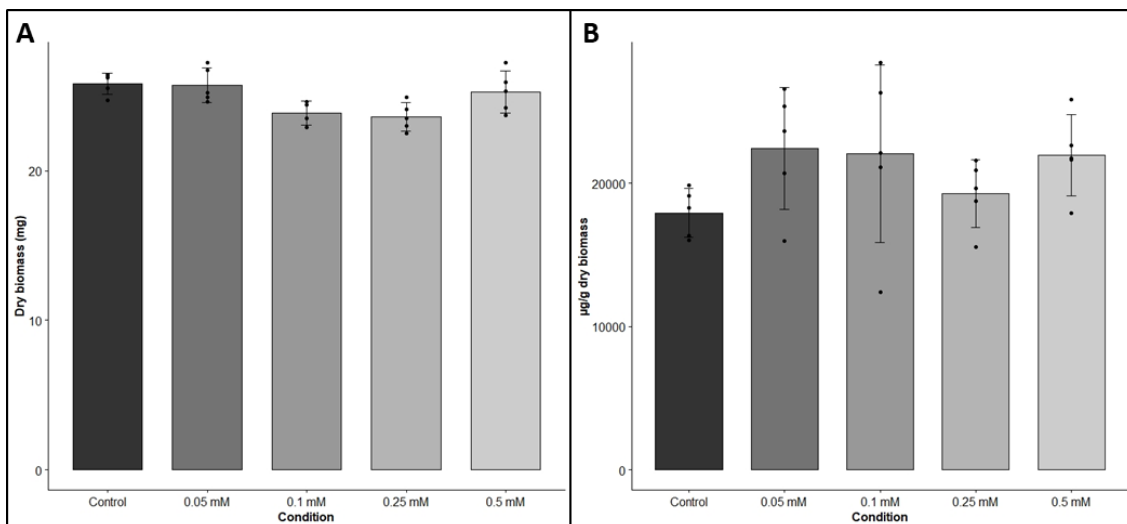


Figure 6. Effet du γ -tocophérol sur la croissance (A) et la production de toxines (B) de *F. graminearum* CBS 185.32. Les étoiles* ($p = 0.05$) and ** ($p = 0.01$) indiquent les différences significatives de comparaison avec la condition contrôle (pairwise Wilcoxon test, contrôle *versus* traitement). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de cinq réplicas biologiques.

A notre connaissance, cette étude est la première qui s'est intéressée à l'effet des tocochromanols du maïs sur la croissance et la production de mycotoxines de *F. graminearum*. Comme détaillé dans la

revue bibliographique (Savignac *et al.* 2022) reportée dans la partie introductive de ce manuscrit, de nombreux arguments suggèrent que les tocochromanols pourraient être impliqués dans différents mécanismes de résistance des plantes aux champignons toxigènes. Parmi les arguments cités figurent leur rôle protecteur *via* leur capacité à piéger les ROS, leur lien avec les voies de signalisation et leurs potentielles propriétés antifongiques et anti-mycotoxines. En effet de telles propriétés ont été décrites vis-à-vis de *Aspergillus flavus* et sa production d'aflatoxine (Norton 1997, 1999) ainsi que *Fusarium verticillioides* producteur de fumonisines (Picot *et al.* 2013). Nos résultats sembleraient indiquer que de telles propriétés ne soient pas vérifiées avec *F. graminearum* producteur de DON.

Chap.3 III) Conclusion générale du chapitre 3

Cette étude centrée sur l'effet antifongique et anti-mycotoxine des antioxydants lipophiles a permis de mettre en évidence les résultats suivants :

- Les caroténoïdes, en particulier la zéaxanthine, la β -cryptoxanthine et le β -carotène ont un effet inhibiteur de la production de toxines par *F. graminearum*. Cet effet est lié à une régulation transcriptionnelle des gènes *tri*.
- L'exposition aux caroténoïdes - lutéine, zéaxanthine et β -carotène - perturbe fortement le métabolisme redox de *F. graminearum*.
- Les tocochromanols les plus représentés du maïs n'ont aucun effet, aux concentrations testées, sur la croissance et la production de toxines de *F. graminearum*.

Nos études ont cependant concerné les antioxydants lipophiles considérés individuellement. Pour approfondir, il serait pertinent de tester l'effet de mélanges de caroténoïdes, de tocochromanols et l'association caroténoïdes + tocochromanols. Ces travaux permettraient d'apporter des réponses sur l'existence éventuelle de réactions de type synergie/antagoniste entre les molécules, réactions qui pourraient expliquer l'efficacité des extraits bruts décrite dans l'article soumis à *JAF*. D'autre part, il serait aussi intéressant d'étudier comment les caroténoïdes et tocochromanols qui ont une capacité reconnue de piégeage des radicaux peroxydes peuvent interférer avec la modulation de la toxigénèse induite par les hydroperoxydes 9 et 13, produits d'oxydation de l'acide linoléique (Nobili *et al.* 2014; Nalam *et al.* 2015).

Discussion générale et perspectives

L'amélioration du niveau de résistance des maïs à la fusariose de type GER est une des pistes les plus prometteuses pour limiter les effets néfastes (diminution de rendement et contamination des grains par la mycotoxine déoxynivalenol/DON) induits par l'infection par *F. graminearum*. Cependant la marge de progrès des programmes de sélection reste limitée de par le caractère complexe polygénique de cette résistance et la connaissance encore insuffisante des mécanismes mis en jeu. L'analyse bibliographique reportée en première partie de ce manuscrit a, en particulier, mis en évidence la nécessité de mieux appréhender le rôle de la composante biochimique de cette résistance, aussi bien au niveau des soies que des grains.

Aussi, un des premiers objectifs de ce travail de thèse a été d'approfondir l'analyse de la composition des soies et grains en s'intéressant à des classes de métabolites encore peu étudiés et susceptibles de jouer un rôle dans la résistance : xanthophylles et tocochromanols chez les grains, métabolites polaires solubles chez les soies. Un second enjeu a consisté en l'analyse des relations entre composition biochimique et degré de résistance, ceci pour un panel de génotypes de maïs plus ou moins tolérants à la fusariose de l'épi, cultivés sur deux années. L'objectif de cette analyse était la mise en évidence de marqueurs biochimiques exploitables pour la sélection de génotypes peu sensibles à l'agent pathogène et à sa production de trichothécènes.

A. Synthèse des résultats majeurs

Dans le cadre de cette thèse nous avons mis en place et optimisé des méthodes analytiques ciblées et non ciblées qui nous ont permis de caractériser la composition en antioxydants lipophiles des grains matures de maïs ainsi que la composition en métabolites polaires et en acides phénoliques liés des soies. Cette caractérisation exhaustive a été menée sur un panel important de génotypes caractérisés par des fonds génétiques différents. A notre connaissance, peu d'études de cette envergure n'avaient été menées auparavant. La diversité de métabolites étudiés ainsi que le nombre de génotypes considérés a permis d'apporter une information riche et nouvelle ; ces données biochimiques pourront ainsi servir de base pour de futurs travaux ciblant d'autres traits physiologiques des maïs.

En plus de la caractérisation biochimique des grains et des soies, ce dispositif expérimental nous a permis d'identifier des molécules potentiellement impliquées dans la résistance/sensibilité du maïs à la fusariose. L'ensemble de ces métabolites est reporté dans le tableau 1 et leur rôle potentiel schématisé dans la figure 1.

Tableau 1. Liste des composés mis en évidence pour leur contribution à la résistance/sensibilité des maïs à *F. graminearum*.

Organe	Composés	Contribution à la résistance/sensibilité
Soies	Acide <i>trans</i> -férulique	Sensibilité
	Acide <i>cis</i> -férulique	Sensibilité
	Dimères acide férulique	Sensibilité
	Acide chlorogénique	Sensibilité
	3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene	Sensibilité
	Eupatiline	Sensibilité
	Feruloyl-hexose	Résistance
Grains	Zéaxanthin	Sensibilité
	β -cryptoxanthine	Sensibilité

A.1- Composition biochimique des soies et résistance à la fusariose

La première partie de ce travail a permis d'apporter de nombreuses informations sur la composition des soies et de leur fraction soluble. Notre dispositif expérimental n'a cependant pas permis d'étudier l'effet « groupe hétérotique du génotype » du fait de la répartition inégale des génotypes selon les groupes et d'un nombre insuffisant d'individus sensibles et tolérants au sein de certains groupes. Dans des études ultérieures, il sera important d'introduire ce facteur.

L'analyse des acides phénoliques liés à la paroi des soies a mis en évidence la richesse en acide férulique (*cis*-, *trans*- et dimères) et acide *para*-coumarique. Les autres acides phénoliques étudiés ayant seulement été retrouvés à l'état de traces et représentant moins de 1% du total des acides phénoliques. Il a aussi été observé que les génotypes les plus sensibles se caractérisaient par des concentrations supérieures en acide férulique et formes dimériques.

L'analyse métabolomique des composés solubles polaires a mis en évidence une discrimination des génotypes selon leur niveau de tolérance/sensibilité à la fusariose de l'épi et a permis l'observation d'un seul métabolite putatif potentiellement lié à la résistance, le feruloyl-hexose. De plus, trois métabolites, putativement identifiés comme l'acide chlorogénique, le 3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene et l'eupatiline, qui sont tous des phénylpropanoïdes et ont été précédemment reportés comme potentiellement impliqués dans les systèmes de défense des plantes contre différentes infections, ont été signalés comme plus abondants chez les variétés les plus sensibles.

Ces données apportent de nouveaux éléments sur la résistance des soies. A notre connaissance, aucune étude préalable cherchant à relier composition métabolique et résistance à *F. graminearum* n'avait permis de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs biochimiques. En effet, ni le travail

de Miller *et al.* (Miller *et al.* 2003) portant sur les alcanes ni celui de Cao *et al.* (Cao *et al.* 2011) ciblant les acides hydroxycinnamiques n'ont conduit à la mise en évidence de relations positives entre présence de certains métabolites dans les soies et niveaux de résistance des maïs.

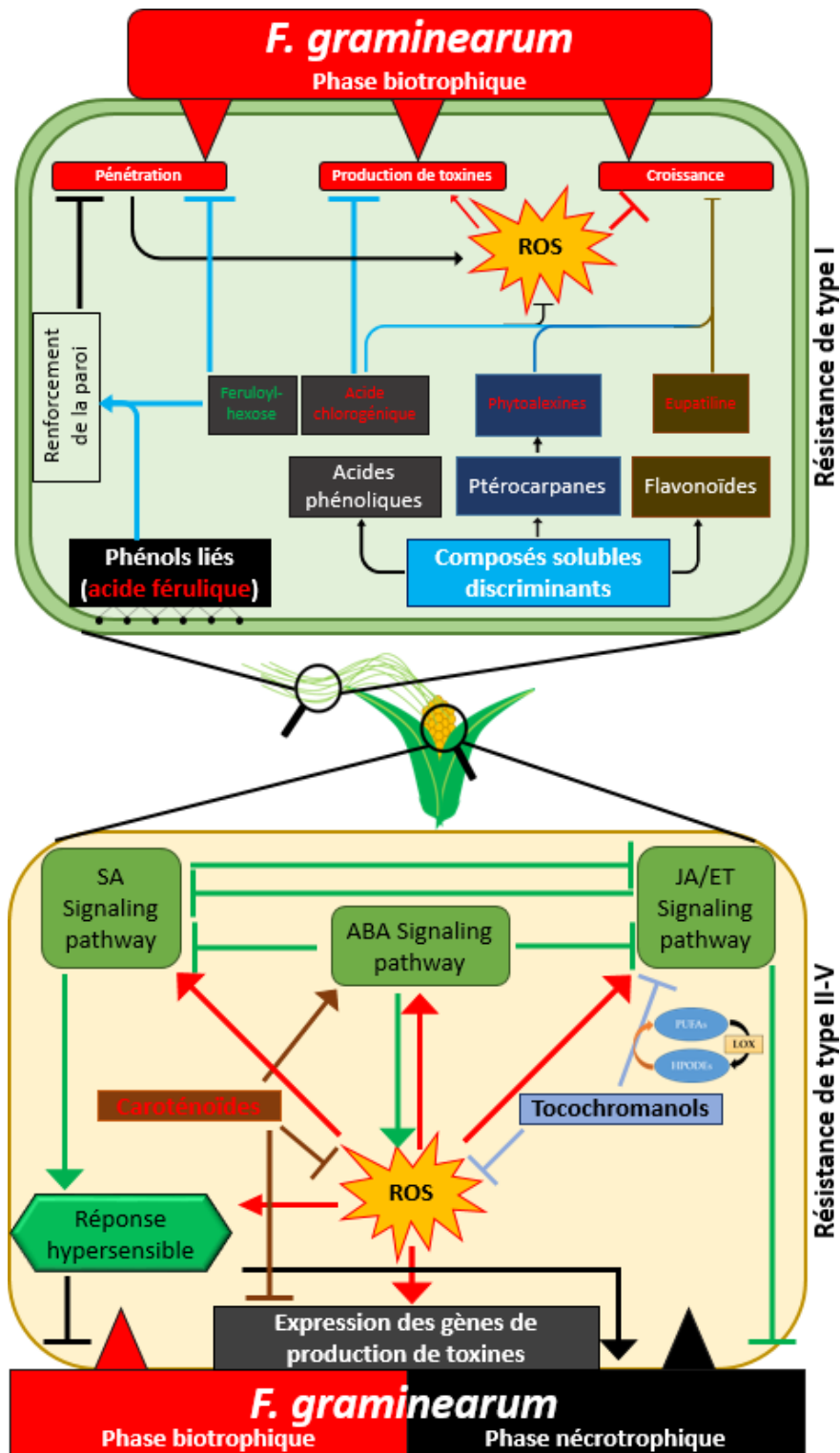


Figure 1. Représentation schématique des résultats majeurs du travail de thèse. Les métabolites notés en rouges présentent un lien avec la sensibilité. Les métabolites notés en vert présentent un lien avec la résistance. ROS : Espèces réactives de l'oxygène. SA : Acide salicylique. ABA : Acide abscissique. JA : Acide jasmonique. ET : Ethylène. PUFAs : Acides gras polyinsaturés. HPODEs : Hydroperoxydes. LOX : Lipoxygénases.

Le potentiel rôle du feruoyl-hexose dans la résistance des soies est compatible avec son implication dans le renforcement des parois cellulaires et en conséquence dans la résistance mécanique des soies (Buanaфина & Morris 2022). Le lien entre les acides phénoliques liés (acide férulique et formes dimériques) ainsi que l'acide chlorogénique soluble avec la susceptibilité peut paraître étonnant au regard des données bibliographiques. En effet, acide férulique et formes dimériques sont aussi décrits comme participant au renforcement des parois (Bily 2003). De plus, ces composés, ainsi que l'acide chlorogénique, sont reportés comme antifongiques et inhibiteurs de la biosynthèse de DON (Boutigny *et al.* 2009). Leur présence dans les grains (de blé et/ou de maïs) est supposée contribuer positivement à la résistance à *F. graminearum* (Gauthier *et al.* 2015; Atanasova-Penichon *et al.* 2016). L'hypothèse émise pour expliquer nos données est que ces composés, et en particulier l'acide chlorogénique et - dans une moindre mesure - l'acide férulique, sont facilement oxydables. La richesse des soies en ces composés pourrait conduire à une fragilité plus importante facilitant l'infection par l'agent pathogène fongique. Pour ce qui est du composé potentiellement identifié à l'eupatilin et celui associé à un ptérocarpane, même si des propriétés antifongiques leur sont souvent attribuées (Jiménez-González *et al.* 2008; Liu *et al.* 2010), trop peu d'études antérieures ont été publiées sur ces métabolites pour pouvoir appuyer nos résultats.

A.2- Composition des grains en antioxydants lipophiles et résistance à la fusariose

Nos études sur la composition des grains ont montré que parmi les antioxydants lipophiles, les tocochromanols sont largement majoritaires avec un total presque dix fois plus important que celui correspondant aux caroténoïdes. Au sein des tocochromanols, les tocophérols sont en moyenne cinq fois plus abondants que les tocotrienols. Pour ces deux dernières familles, les formes majoritaires sont les isomères γ et α . Pour ce qui est des caroténoïdes, la lutéine est la forme majoritairement retrouvée, suivie par la zéaxanthine et la β -cryptoxanthine. Le β -carotène est pour sa part présent seulement à l'état de traces et souvent présent dans des concentrations trop faibles pour être quantifié. Nos données ont illustré le fait que les niveaux et compositions en antioxydants lipophiles dépendaient du génotype et plus précisément du groupe hétérotique, en accord avec les données de la littérature sur les relations entre concentrations en antioxydants lipophiles et origine génétique des génotypes de maïs (Diepenbrock *et al.* 2021). Ainsi, les génotypes du groupe Stiff Stalk Synth semblent être caractérisés par une richesse en lutéine et des concentrations en γ et α tocochromanols inférieures à celles des autres génotypes étudiés. De même, une des caractéristiques des génotypes du groupe Early IX/XI pourrait être leur richesse en β -cryptoxanthine. Notre étude a aussi montré des disparités entre les deux années d'études, en particulier pour les tocochromanols (concentrations différentes d'un facteur 2 en moyenne), et ceci malgré un lieu de production commun. Ces différences ont été reliées

à des différences climatiques, avec une année marquée par des épisodes de canicule et de fortes pluies et une année moins atypique. Ces observations corroborent l'importance des antioxydants lipophiles dans la tolérance aux stress abiotiques, leur biosynthèse étant régulée par la plante en réponse aux stress environnementaux (Munné-Bosch 2005; De Santis *et al.* 2021).

Pour l'analyse des relations composition en antioxydants lipophiles des grains/sensibilité à la fusariose, il ne nous a pas été possible d'introduire le facteur groupe hétérotique au regard du faible nombre de génotypes classés sensibles et tolérants au sein de certains groupes. Compte tenu des différences reportées ci-dessus, il sera important dans les études ultérieures d'introduire ce paramètre. L'analyse bibliographique et en particulier la revue (Savignac *et al.* 2022) reportée en première partie de ce manuscrit décrit tout un faisceau d'arguments en faveur d'une contribution des tocochromanols dans la résistance des céréales aux champignons toxigènes. Nos données n'ont cependant pas permis d'étayer ces hypothèses. Aucune corrélation significative entre teneurs /compositions en tocochromanols et sensibilité à la fusariose des maïs n'a été mise en évidence avec notre dispositif expérimental. Ce travail de thèse a considéré la résistance constitutive avec l'objectif d'identifier des marqueurs biochimiques exploitables dans les stratégies de phénotypage de la résistance. Dans une étude récente s'intéressant à la résistance induite par l'infection par *Fusarium verticillioides* et *proliferatum*, deux producteurs de mycotoxines de la famille des fumonisines, Waskiewicz *et al.* (Waskiewicz *et al.* 2022) ont indiqué une augmentation des teneurs en tocochromanols induite par l'infection fongique chez les génotypes les plus tolérants. Cette étude qui a concerné uniquement quatre génotypes demande à être complétée ; elle ouvre cependant de nouvelles perspectives pour investiguer la contribution des tocochromanols à la résistance des maïs aux espèces fusariennes toxigènes. Contrairement aux données associées aux tocochromanols, les analyses ciblant les caroténoïdes ont permis de mettre en évidence une discrimination des génotypes selon leur niveau de résistance à la fusariose causée par *F. graminearum*. La présence de quantités plus importantes de caroténoïdes dans les grains, notamment la zéaxanthine et la β -cryptoxanthine, a été mise en évidence chez les génotypes les plus sensibles à la fusariose de type GER. Cette relation entre sensibilité et teneur en caroténoïdes pourrait être liée à l'implication des caroténoïdes dans la biosynthèse de l'acide abscissique, une phytohormone contribuant à la résistance aux stress abiotiques et qui est décrite comme antagoniste de l'acide jasmonique, qui, elle, participe à la résistance aux phytopathogènes nécrotrophes (Robert-Seilaniantz *et al.* 2007). Cette contribution des caroténoïdes à la sensibilité des maïs n'est à priori pas associée à un effet promoteur de ces antioxydants lipophiles sur la croissance et production de DON par *F. graminearum* puisque nos études *in vitro* ont, au contraire, montré une activité inhibitrice de la zéaxanthine. Ces études *in vitro* ont aussi permis de mettre en évidence une régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes de biosynthèse du DON

induite par l'exposition à la zéaxanthine ; cette régulation pourrait être associée à une forte perturbation du potentiel redox du milieu environnant les hyphes fongiques, ainsi que l'a démontré notre analyse transcriptomique ciblant un panel de gènes fongiques intervenant dans l'homéostasie redox. A notre connaissance, aucune étude mécanistique décrivant l'effet de caroténoïdes sur la biosynthèse de DON n'avait été publiée auparavant.

B. Analyse critique et perspectives

Si l'étude décrite dans ce manuscrit a conduit à des résultats nouveaux sur la résistance du maïs à *F. graminearum*, elle a aussi mis en avant les limites du dispositif expérimental déployé et ouvert la voie à de nombreuses perspectives.

B.1- Le panel de génotypes et son phénotypage

B.1.a Intégrer une plus grande diversité de génotypes, années et lieux de production

Comme discuté à plusieurs reprises dans ce manuscrit et compte tenu des différences métaboliques observés selon l'origine du génotype (en particulier pour les antioxydants lipophiles) et l'année de récolte, il sera important d'élargir le panel d'études ainsi que la diversité de conditions environnementales de culture. Nos travaux n'ont pas permis de distinguer les groupes hétérotiques selon leur niveau de résistance à la fusariose alors que certains (en particulier le groupe Early IX/XI) étaient caractérisés par une richesse supérieure en β -cryptoxanthine, un potentiel biomarqueur de sensibilité.

B.1.b Affiner le caractère résistant/sensible des génotypes

Comme décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, le phénotypage de la résistance des maïs à la fusariose de type GER est complexe (en particulier du fait des différentes composantes liées aux soies ou aux grains) et se heurte à plusieurs obstacles ; sa fiabilité peut parfois être questionnée.

Limites des méthodes actuelles

Le phénotypage des génotypes utilisé dans notre étude a été réalisé par Syngenta®, basé sur des notations réalisées sur plusieurs années, en conditions d'infection naturelle et inoculation artificielle par une souche de *F. graminearum*.

L'infection naturelle consiste à noter les taux de symptômes sur épi lorsque la pression en *F. graminearum* est suffisante sur l'ensemble de la parcelle. Cette méthode de notation permet une bonne représentativité de la résistance du maïs notamment de la résistance de type I (résistance des

soies) mais ne permet pas de différencier la survenue d'infections par voie vasculaire ou suite à des blessures à des périodes plus précoces par des insectes. D'autre part, la notation de symptômes induits par *F. graminearum* peut aussi être parfois rendue difficile par l'existence de contaminations fongiques des épis par d'autres agents pathogènes.

L'inoculation artificielle utilisée par Syngenta consiste en l'injection dans le canal des soies d'une suspension liquide de spores d'une souche toxigène de *F. graminearum*. Cette inoculation est réalisée à environ 2 cm du sommet de l'épi. Cette méthode a pour but de mimer l'infection par les soies des épis. Elle a été préférée à une méthode de « spraying » des spores sur les soies, qui peut conduire à un faible pourcentage de germination des spores du fait d'une trop faible humidité. L'injection des spores directement dans les spathes du maïs permet de mieux conserver l'humidité en protégeant la suspension d'une partie de la chaleur et du contact avec le soleil. Cependant, cette méthode introduit des biais par rapport à une infection naturelle d'une part car les spores et la germination s'affranchissent d'une bonne partie de leur croissance sur la totalité de la longueur des soies, et d'autre part la méthode d'inoculation peut « court-circuiter » la résistance de soies. En effet, il arrive que la solution de spores coule le long des soies et atteigne directement le sommet de l'épi et conduise ainsi à une notation de la résistance de type II (pénétration des grains). La solution de spores peut aussi glisser le long des spathes conduisant à un phénomène nommé le « flooding », qui entraîne une infection vasculaire avec des symptômes très violents et en conséquence une note maximale de sévérité. Ceci a été observé sur des génotypes contrôles connus comme résistants en infection naturelle.

Aussi, pour garantir la validité des études cherchant à corrélérer composition biochimique et seuils de résistance à GER, il serait important d'augmenter le degré de fiabilité des notations de génotypes. Plusieurs méthodes supplémentaires pourraient être mises en œuvre, et en particulier des méthodes d'inoculations artificielles ciblant spécifiquement les composantes de la résistance de type I et II.

Optimiser l'évaluation de la résistance de type I

Une méthode de spraying de spores sur les soies pour simuler une infection naturelle plus proche de la réalité en champ pourrait être mise en place systématiquement pour noter la résistance de type I. Cette procédure devra s'accompagner d'une brumisation adéquate, afin de favoriser la germination des spores et leur progression sur les soies. Une étude complémentaire en environnement contrôlé de type serre ou armoires de cultures, ce qui permettrait un contrôle de la température et de l'humidité, pourrait aussi être envisagée.

Une autre approche pour mesurer le niveau de résistance des soies à l'infection par *F. graminearum* et relier vitesse de progression et composition biochimique serait de suivre *in vitro* la vitesse de

croissance du champignon inoculé à l'extrémité des soies. Pour cela des méthodes similaires à celles mises en place par Miller *et al.* (Miller *et al.* 2007) pourraient être utilisées et l'emploi d'une souche GFP de *F. graminearum* associée à une quantification optimisée de la fluorescence permettrait de donner une valeur quantitative à la vitesse de progression du champignon et de comparer ces vitesses selon le niveau de résistance des maïs dont sont issues les soies.

Optimiser l'évaluation de la résistance de type II

Pour évaluer la résistance de type II, une solution de spores pourrait être mise au contact des grains de maïs directement à l'intérieur des spathes de manière contrôlée ce qui permettrait de tester la résistance des grains à la pénétration du champignon. La méthode dite des cure-dents qui consiste à insérer un cure-dent imprégné d'une solution de spores appliqué à un stade précoce de maturité du grain pourrait aussi permettre de tester la composante « transmission entre grains » de la résistance.

Utilisation de l'imagerie

Par ailleurs, pour faciliter les phénotypages visuels, de nouvelles méthodes de notation assistées par machines sont en développement. Actuellement, des techniques sont mises en place en interne par l'entreprise Syngenta pour permettre une notation assistée par de l'imagerie haut débit et du deep learning facilitant la mise en œuvre des notations directement à la récolte grâce à un système embarqué sur les moissonneuses-batteuses. Par ailleurs d'autres méthodes d'évaluation des symptômes de fusariose pourraient être mises en place pour limiter les erreurs de notation où les biais apportés par les notateurs ; des approches de notation par infrarouges ou exploitant des caméras hyperspectrales déjà testées sur d'autres cultures pourraient être envisagées (Barbedo *et al.* 2015; Lim *et al.* 2017; Srivastava & Mishra 2022).

B.2. Validation de la structure et de l'intérêt des biomarqueurs candidats proposés par cette étude

Plusieurs métabolites potentiellement liés à la résistance des maïs ont été identifiés dans cette étude. Pour les métabolites mis en évidence par l'approche métabolomique, l'identification était une identification putative. D'autre part, pour tous ces métabolites, leur rôle dans les interactions entre le maïs et *F. graminearum* nécessite d'être élucidé.

B.2.a Confirmation de la structure des composés putativement identifiés

Pour les composés putativement identifiés d'après leur rapport m/z et la comparaison avec les bases de données, l'emploi d'une solution de standard de la molécule pure permettra la comparaison des temps de rétention, et spectre MS² et la confirmation de la structure du métabolite candidat. Un des métabolites d'intérêt que nous avons putativement identifié correspondrait à l'eupatilin. Cependant,

à notre connaissance, la présence de ce flavonoïde n'a jamais été décrite dans les tissus de maïs. L'eupatilin existe à l'état de standard commercial et il sera ainsi possible de valider/réfuter notre identification putative. Une telle procédure sera aussi possible avec le ptérocarpane (3,9-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]chromene). D'autres signaux m/z discriminants entre génotype sensible et résistant ont été mis en évidence dans notre étude métabolomique ciblant les soies et n'ont pas pu être identifiés. Pour ces signaux (dont les différences d'abondance sont décrites figure 7 chapitre 1), l'identification ne sera pas possible sans une étape de purification et analyse ultérieure par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Pour l'ensemble des composés dont l'identification a été confirmée - acide férulique, chlorogénique, eupatiline et ptérocarpane - mais aussi caroténoïdes, des méthodes analytiques ciblées pourront être définies et l'analyse d'un nombre plus importants de génotypes de maïs permettra d'apporter de nouveaux arguments en faveur de leur contribution à la sensibilité/résistance des maïs à *F. graminearum*.

B.2.b Validation du rôle des métabolites candidats par approches génétiques

L'utilisation de mutants délétés pour certaines voies métaboliques est utilisée depuis de nombreuses années dans les domaines de la recherche notamment chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cette stratégie a permis de mettre en évidence le rôle physiologique de certains des composés considérés dans notre étude, comme l'importance des tocochromanols dans le contrôle de l'accumulation de phytohormones (Allu *et al.* 2017) ou encore leur importance dans la résistance aux stress hydriques ou lumineux (Kobayashi & DellaPenna 2008; Khalatbari *et al.* 2015). Cependant la mise en place de telles méthodes chez une plante comme le maïs pourrait s'avérer plus complexe. En effet, *Arabidopsis thaliana* est un diploïde tandis que le maïs est tétraploïde, ce qui implique qu'une délétion de gènes doit pouvoir être réalisée sur tous les chromosomes portant une copie du gène, pouvant donc aller jusqu'à quatre gènes. A l'heure actuelle, aucune mutation délétère n'a pu être mise en place de manière ciblée chez le maïs, illustrant les difficultés d'obtention de ces mutants. Actuellement, l'ensemble des mutants utilisés dans les études chez le maïs sont issus de croisements avec des plantes possédant naturellement l'absence de gènes. Ainsi, et si on prend l'exemple des tocochromanols, la première étape serait d'identifier des plantes délétères pour le gène *ZmVTE4* ce qui induirait une incapacité de la plante à synthétiser les tocochromanols. Une autre méthode qui permettrait la délétion précise de ces gènes serait l'utilisation de génie génétique comme le système CRISPR/Cas9 (Jiang & Doudna 2017). Ces méthodes ont déjà montré leur efficacité sur le maïs, notamment pour réaliser des mutants knockout (Feng *et al.* 2016; Doll *et al.* 2019). Cependant des délétions pour les différentes molécules que nous avons mises en évidence comme impliquées dans la sensibilité et/ou

la résistance pourraient entraîner des conséquences néfastes pour la plante et sa viabilité. En effet les tocopherols sont fortement impliqués dans les résistances aux stress abiotiques comme indiqué dans la revue présentée dans l'introduction générale, les caroténoïdes sont impliqués dans la production de la phytohormone acide abscissique, elle-même impliquée dans la réponse aux stress abiotiques (Muhammad Aslam *et al.* 2022), et les acides phénoliques et leurs dérivés sont très importants dans la structuration des parois cellulaires et donc dans le maintien mécanique de la plante. L'absence de ces composés pourrait donc conduire à une perte de la viabilité de la plante et empêcher sa croissance jusqu'au stade de production des grains et rendrait donc ces études inutilisables dans la problématique GER. De plus les gènes ne sont pas constitutivement exprimés de la même façon dans tous les organes, et il serait impossible de cibler spécifiquement les soies ou les grains aux stades nécessaires à la modification génétique.

Une autre méthode pourrait être la surexpression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de nos molécules d'intérêt. Cette méthode est plus simple à mettre en place et a déjà montré son efficacité chez le maïs notamment sur les voies de l'acide abscissique et de l'éthylène dans la tolérance à la sécheresse (Shi *et al.* 2015; Brugière *et al.* 2017). Ainsi, au vu de nos résultats, la surexpression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les grains devrait induire une plus grande sensibilité à l'infection par *F. graminearum*. Cependant, cette stratégie se heurte aussi aux difficultés liées à l'expression différenciée dans les différents organes de la plante de maïs.

Une autre approche génétique pour valider l'importance de nos composés dans la résistance à GER serait de rechercher la colocalisation de leurs gènes de biosynthèse avec les QTLs de résistance. De nombreux QTLs de résistance à GER ont été décrits dans différentes études (Martin *et al.* 2011; Kebede *et al.* 2016; Han *et al.* 2016, 2017; Wen *et al.* 2021; Akohoue & Miedaner 2022). Bien que ces QTLs n'expliquent pour la plupart que peu de variance phénotypique (< 10 % de la variance totale pour la plupart), plusieurs QTLs ont pu être reliés aux différents niveaux de résistance du maïs tel que la résistance des soies, des grains ou encore l'accumulation de mycotoxines (Akohoue & Miedaner 2022). D'autre part, des QTLs ont été associés avec l'accumulation dans les grains de maïs des caroténoïdes (Wong *et al.* 2004; Chander *et al.* 2008b; Jittham *et al.* 2017; Ashokkumar *et al.* 2020), des tocopherols (Chander *et al.* 2008a; Diepenbrock *et al.* 2017; Baseggio *et al.* 2019; Tanaka *et al.* 2022), ainsi que des flavonoïdes dans les soies (Byrne *et al.* 1998; Bushman *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2003; Guo *et al.* 2004). L'analyse intégrée des QTLs de résistance à GER et des QTLs liés à la production des métabolites d'intérêt pourrait permettre de révéler l'existence d'événements de colocalisation de ces QTLs. L'introgession de ces QTLs communs permettrait alors de déterminer leur importance dans les mécanismes de résistance à GER.

B.2.c Considérer les voies métaboliques ciblées par notre étude en interaction avec les autres voies de signalisation des mécanismes de défense

La résistance à *F. graminearum* implique un réseau de mécanismes de défense bien plus complexe que la simple interaction métabolite de la plante – champignon. Il sera ainsi important d'intégrer nos résultats au regard de la complexité de l'arsenal chimique que la plante peut utiliser pour se défendre.

Connexion avec les phytohormones

Dans cette thèse, nous avons souvent indiqué l'implication de nos molécules d'intérêt dans des voies des phytohormones, notamment les voies de l'acide jasmonique pour les tocochromanols et les voies de l'acide abscissique pour les caroténoïdes. Ces voies jouent un rôle clef dans la réponse à l'infection par *F. graminearum*. Préciser comment les antioxydants lipophiles modulent ces voies permettrait de progresser dans la compréhension de leur contribution aux mécanismes de résistance/sensibilité. Plusieurs questions restent à être élucidées. Tocochromanols et caroténoïdes ont-ils les mêmes propriétés de piégeage des hydroperoxydes ? Au sein des tocochromanols et des caroténoïdes, existe-t-il des spécificités selon les isomères et les métabolites ? Analyser les compositions en antioxydants lipophiles, leur modification suite à une infection par *F. graminearum* et comparer ces données avec l'analyse de la réponse de la plante en termes de phytohormones pourrait apporter de nouveaux éléments de compréhension.

Connexion avec le burst oxydatif

La production de ROS est une des premières réponses des plantes à l'infection par un agent fongique. Les ROS possèdent des propriétés antimicrobiennes et jouent un rôle clef de signalisation. Ainsi, la synthèse de phytoalexines est induite par la production de ROS en réponse à une infection chez les plantes (Thoma *et al.* 2003). Les ROS sont aussi impliquées dans un grand nombre de voies métaboliques participant à la résistance, notamment les voies des phytohormones et la voie de l'apoptose. L'ensemble des molécules mises en évidence dans cette thèse sont des molécules possédant des propriétés antioxydantes. Le potentiel antioxydant des tocochromanols a été détaillé dans la partie introductive de ce manuscrit (Savignac *et al.* 2022), celui des caroténoïdes et phénylpropanoïdes a fait l'objet de nombreuses études (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh 2011; Ramel *et al.* 2012). Ainsi, l'ensemble de nos métabolites candidats est susceptible d'interférer avec la réponse oxydative de la plante. Préciser spécifiquement le rôle relatif de chacun permettrait de mieux appréhender leur contribution potentielle à la sensibilité/résistance des maïs. Une hypothèse, qui reste à être démontrée, soulevée par nos données pourrait être que la zéaxanthine, marqueur de

sensibilité, contribue à réduire le niveau de ROS et à limiter leur impact négatif sur *F. graminearum*. Nos travaux ont aussi mis en évidence que ce potentiel antioxydant, et en particulier celui des caroténoïdes, pouvait aussi être à l'origine d'une action de modulation de la toxino-génèse. En effet, il est clairement établi qu'un stress oxydant est un élément stimulateur de la production de DON (Ponts *et al.* 2007) ; la réduction de ce stress par l'action des caroténoïdes pourrait expliquer leur effet inhibiteur de la toxino-génèse.

Les antioxydants lipophiles à l'interface entre stress abiotique et biotique

Les stress abiotiques sont reconnus comme étant des facteurs interagissant avec les contaminations par les champignons (Pandey *et al.* 2017). Dans certaines situations, ces stress abiotiques ont montré qu'ils pouvaient faciliter les infections par différentes espèces toxino-gènes (Desaint *et al.* 2021). Le rôle des antioxydants lipophiles, décrits comme protecteurs contre les stress abiotiques, dans ces relations stress biotique/stress abiotique serait particulièrement intéressant à analyser. Pour ce faire, une inoculation par *F. graminearum* de différents génotypes de maïs cultivés dans des situations de stress/non stress et l'analyse des compositions en antioxydants lipophiles (constitutives et induites) dans les différentes conditions de culture permettrait certainement d'apporter des premiers éléments de réponse.

B.3) Approfondir la connaissance sur l'effet des métabolites candidats sur la croissance et toxino-génèse de *F. graminearum*

Nos travaux en conditions *in vitro* ont mis en évidence la capacité de certains caroténoïdes à induire une réponse antioxydante chez *F. graminearum*, à inhiber l'expression des gènes *tri* et la production de DON. Ces résultats demandent à être complétés.

- Tous nos tests ont été réalisés avec une souche unique de *F. graminearum*, la souche CBS 185.32 choisie pour son potentiel élevé de production de mycotoxines. Cependant cette souche n'est pas forcément la plus représentative de l'ensemble des souches retrouvées dans la nature. De plus cette souche est différente de celle utilisée par l'entreprise pour réaliser les inoculations en plein champ. La diversité des souches au sein de l'espèce *F. graminearum* a été largement étudiée dans la littérature et en particulier la diversité de potentiel toxino-gène caractérisant ces souches (Perincherry *et al.* 2019). Les effets des caroténoïdes pourraient en effet varier en fonction du niveau de mycotoxines produites ou des couples de mycotoxines (chénotype DON-15ADON, DON-3ADON, NIV-FX) et pourraient aussi être différents vis-à-vis de la production de zéaralénone, autre mycotoxine potentiellement synthétisée par *F. graminearum*.

- Si les extraits caroténoïdes des grains ont été montrés comme actifs contre *F. graminearum*, une grande partie de nos travaux a considéré les caroténoïdes (zéaxanthine, lutéine et β -carotène)

individuellement. Il serait intéressant de combiner ces différentes molécules et d'inclure aussi la β -cryptoxanthine pour mettre en évidence d'éventuelles interactions antagonistes ou synergiques dans les effets inhibiteurs des caroténoïdes. Associer les tocochromanols à ces mélanges pourrait aussi être une perspective pertinente à explorer.

- L'activité antifongique et anti-mycotoxine des acides phénoliques est largement décrite dans la littérature (Chtioui *et al.* 2022). L'activité des formes dimériques de l'acide férulique a aussi été fortement suggérée par Boutigny *et al.* (Boutigny *et al.* 2009). Après confirmation de la structure des métabolites identifiés putativement comme de l'eupatilin et un ptérocarpane, il sera intéressant d'introduire ces métabolites, pour lesquels des standards existent, dans nos études *in vitro*. A notre connaissance leur effet vis-à-vis de *F. graminearum* n'a jamais été étudié jusqu'à présent.

C. Conclusion générale

Cette thèse aura donc permis la mise en avant de plusieurs métabolites liés à la sensibilité et à la résistance des maïs à *F. graminearum* et aura ouvert plusieurs perspectives de recherche sur la contribution de métabolites jusqu'à présent peu étudiés aux mécanismes de défense des plantes. Après validation de la structure de ces métabolites et élargissement de l'analyse à plus de génotypes et conditions environnementales de culture, de potentiels marqueurs biochimiques pourraient être proposés aux sélectionneurs pour aider à l'avancée des programmes de sélection pour une meilleure résistance à *F. graminearum* et des niveaux réduits de DON dans les récoltes. Ce travail s'est focalisé sur la résistance constitutive et les biomarqueurs proposés pourraient ainsi être utilisés comme outils de phénotypage de la résistance à GER. Comme discuté tout au long de ce manuscrit, ce phénotypage est aujourd'hui une étape critique et source d'erreurs. Si le lien caroténoïdes/susceptibilité se confirme, il pourra être envisagé des stratégies de type infrarouge pour évaluer le contenu des grains en ces composés. Enfin, l'approche mise en œuvre dans ce travail de thèse a démontré la puissance de l'outil métabolomique pour aborder la problématique de la résistance des plantes à des agents pathogènes fongiques. Ces méthodes ouvrent la voie à de nouvelles méthodes de phénotypage à haut débit basées sur la métabolomique plutôt que la génétique et offrent aussi de nouvelles pistes pour la sélection génétique ciblant les gènes associés à l'abondance des métabolites candidats.

Références (Les citations réfèrent aux parties hors articles)

- AKOHOUE, F. & MIEDANER, T. (2022). Meta-analysis and Co-expression Analysis Revealed Stable QTL and Candidate Genes Conferring Resistances to FUSARIUM and GIBBERELLA Ear Rots while Reducing Mycotoxin Contamination in Maize. *Frontiers in Plant Science*, **13**, 1050891.
- ALEXANDER, N.J., PROCTOR, R.H. & MCCORMICK, S.P. (2009). Genes, Gene Clusters, and Biosynthesis of Trichothecenes and Fumonisin in FUSARIUM. *Toxin Reviews*, **28**, 198–215.
- ALI, M.L., TAYLOR, J.H., JIE, L., SUN, G., WILLIAM, M., KASHA, K.J., REID, L.M. & PAULS, K.P. (2005). Molecular Mapping of QTLs for Resistance to GIBBERELLA Ear Rot, in Corn, Caused by FUSARIUM GRAMINEARUM. *Genome*, **48**, 521–533.
- ALLU, A.D., SIMANCAS, B., BALAZADEH, S. & MUNNÉ-BOSCH, S. (2017). Defense-Related Transcriptional Reprogramming in Vitamin E-Deficient Arabidopsis Mutants Exposed to Contrasting Phosphate Availability. *Frontiers in Plant Science*, **8**.
- ALVAREZ, C.L., AZCARATE, M.P. & PINTO, V.F. (2009). Toxigenic Potential of FUSARIUM GRAMINEARUM SENSU STRICTO Isolates from Wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, **135**, 131–135.
- ASHOKKUMAR, K., GOVINDARAJ, M., KARTHIKEYAN, A., SHOBHANA, V.G. & WARKENTIN, T.D. (2020). Genomics-Integrated Breeding for Carotenoids and Foliates in Staple Cereal Grains to Reduce Malnutrition. *Frontiers in Genetics*, **11**.
- ASTOLFI, P., DOS SANTOS, J., SCHNEIDER, L., GOMES, L.B., SILVA, C.N., TESSMANN, D.J. & DEL PONTE, E.M. (2011). Molecular Survey of Trichothecene Genotypes of FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex from Barley in Southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, **148**, 197–201.
- ATANASOFF-KARDJALIEFF, A.K. & STUDDT, L. (2022). Secondary Metabolite Gene Regulation in Mycotoxigenic FUSARIUM Species: A Focus on Chromatin. *Toxins*, **14**, 96.
- ATANASOVA-PENICHON, V., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. (2016). Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to FUSARIUM and Mycotoxin Accumulation. *Frontiers in Microbiology*, **7**.
- ATANASOVA-PENICHON, V., LEGOHEC, L., BERNILLON, S., DEBORDE, C., MAUCOURT, M., VERDAL-BONNIN, M.-N., PINSON-GADAIS, L., PONTS, N., MOING, A. & RICHARD-FORGET, F. (2018). Mycotoxin Biosynthesis and Central Metabolism Are Two Interlinked Pathways in FUSARIUM GRAMINEARUM, as Demonstrated by the Extensive Metabolic Changes Induced by Caffeic Acid Exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, **84**, e01705-17.
- ATANASOVA-PENICHON, V., PONS, S., PINSON-GADAIS, L., PICOT, A., MARCHEGAY, G., BONNIN-VERDAL, M.-N., DUCOS, C., BARREAU, C., ROUCOLLE, J., SEHABIAGUE, P., CAROLO, P. & RICHARD-FORGET, F. (2012). Chlorogenic Acid and Maize Ear Rot Resistance: a Dynamic Study Investigating FUSARIUM GRAMINEARUM Development, Deoxynivalenol Production, and Phenolic Acid Accumulation. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, **25**, 1605–1616.

- AWUCHI, C.G., ONDARI, E.N., OGBONNA, C.U., UPADHYAY, A.K., BARAN, K., OKPALA, C.O.R., KORZENIOWSKA, M. & GUINÉ, R.P.F. (2021). Mycotoxins Affecting Animals, Foods, Humans, and Plants: Types, Occurrence, Toxicities, Action Mechanisms, Prevention, and Detoxification Strategies-A Revisit. *Foods (Basel, Switzerland)*, **10**, 1279.
- BARBEDO, J.G.A., TIBOLA, C.S. & FERNANDES, J.M.C. (2015). Detecting FUSARIUM Head Blight in Wheat Kernels using Hyperspectral Imaging. *Biosystems Engineering*, **131**, 65–76.
- BASEGGIO, M., MURRAY, M., MAGALLANES-LUNDBACK, M., KACZMAR, N., CHAMNESS, J., BUCKLER, E.S., SMITH, M.E., DELLA PENNA, D., TRACY, W.F. & GORE, M.A. (2019). Genome-Wide Association and Genomic Prediction Models of Tocochochromanols in Fresh Sweet Corn Kernels. *The Plant Genome*, **12**, 180038.
- BASSETTI, P. & WESTGATE, M.E. (1993). Emergence, Elongation, and Senescence of Maize Silks. *Crop Science*, **33**.
- BATTILANI, P., LANUBILE, A., SCALA, V., REVERBERI, M., GREGORI, R., FALAVIGNA, C., DALL'ASTA, C., PARK, Y.-S., BENNETT, J., BORREGO, E.J. & KOLOMIETS, M.V. (2018). Oxylipins from both Pathogen and Host Antagonize Jasmonic Acid-mediated Defence via the 9-lipoxygenase Pathway in FUSARIUM VERTICILLIOIDES Infection of Maize. *Molecular Plant Pathology*, **19**, 2162–2176.
- BAYRAM, Ö., KRAPPMANN, S., NI, M., BOK, J.W., HELMSTAEDT, K., VALERIUS, O., BRAUS-STROMEYER, S., KWON, N.-J., KELLER, N.P., YU, J.-H. & BRAUS, G.H. (2008). VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science*, **320**, 1504–1506.
- BEADLE, G.W. (1981). Origin of Corn: Pollen Evidence. *Science*, **213**, 890–892.
- BECHER, R., WEIHMANN, F., DEISING, H.B. & WIRSEL, S.G. (2011). Development of a Novel Multiplex DNA Microarray for FUSARIUM GRAMINEARUM and Analysis of Azole Fungicide Responses. *BMC Genomics*, **12**, 52.
- BERNARDO, R. (2008). Molecular Markers and Selection for Complex Traits in Plants: Learning from the Last 20 Years. *Crop Science*, **48**, 1649–1664.
- BILY, A. (2003). Importance des Rôles des Déhydrodimères d'Acide Férulique et Autres Phénylpropanoïdes dans les Mécanismes de Résistance de ZEA MAYS L. à FUSARIUM GRAMINEARUM Schwabe.
- BILY, A.C., REID, L.M., TAYLOR, J.H., JOHNSTON, D., MALOUIN, C., BURT, A.J., BAKAN, B., REGNAULT-ROGER, C., PAULS, K.P., ARNASON, J.T. & PHILOGENE, B.J.R. (2003). Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to FUSARIUM GRAMINEARUM. *Phytopathology*, **93**, 712–719.
- BOENISCH, M.J. & SCHÄFER, W. (2011). FUSARIUM GRAMINEARUM Forms Mycotoxin Producing Infection Structures on Wheat. *BMC Plant Biology*, **11**, 110.
- BOLANOS-CARRIEL, C., WEGULO, S.N., BAENZIGER, P.S., ESKRIDGE, K.M., FUNNELL-HARRIS, D., MCMASTER, N., SCHMALE, D.G. & HALLEN-ADAMS, H.E. (2020). Tri5 Gene Expression Analysis During Postharvest Storage of Wheat Grain from Field Plots Treated with a Triazole and a Strobilurin Fungicide. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **42**, 547–559.
- BOUTIGNY, A.-L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M.-N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. (2009). Ferulic Acid, an Efficient Inhibitor of Type B Trichothecene

- Biosynthesis and Tri Gene Expression in FUSARIUM Liquid Cultures. *Mycological Research*, **113**, 746–753.
- BOUTIGNY, A.-L., WARD, T.J., VAN COLLER, G.J., FLETT, B., LAMPRECHT, S.C., O'DONNELL, K. & VILJOEN, A. (2011). Analysis of the FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex from Wheat, Barley and Maize in South Africa Provides Evidence of Species-specific Differences in Host Preference. *Fungal genetics and biology: FG & B*, **48**, 914–920.
- BRODHAGEN, M., TSITSIGIANNIS, D.I., HORNING, E., GOEBEL, C., FEUSSNER, I. & KELLER, N.P. (2008). Reciprocal Oxylin-mediated Cross-talk in the ASPERGILLUS-seed Pathosystem. *Molecular Microbiology*, **67**, 378–391.
- BRUGIÈRE, N., ZHANG, W., XU, Q., SCOLARO, E.J., LU, C., KAHSAY, R.Y., KISE, R., TRECKER, L., WILLIAMS, R.W., HAKIMI, S., NIU, X., LAFITTE, R. & HABBEN, J.E. (2017). Overexpression of RING Domain E3 Ligase ZmXerico1 Confers Drought Tolerance through Regulation of ABA Homeostasis. *Plant Physiology*, **175**, 1350–1369.
- BUANAFINA, M.M. DE O. & MORRIS, P. (2022). The Impact of Cell Wall Feruloylation on Plant Growth, Responses to Environmental Stress, Plant Pathogens and Cell Wall Degradability. *Agronomy*, **12**, 1847.
- BUHROW, L.M., CRAM, D., TULPAN, D., FOROUD, N.A. & LOEWEN, M.C. (2016). Exogenous Abscisic Acid and Gibberellic Acid Elicit Opposing Effects on FUSARIUM GRAMINEARUM Infection in Wheat. *Phytopathology*, **106**, 986–996.
- BUSHMAN, B.S., SNOOK, M.E., GERKE, J.P., SZALMA, S.J., BERHOW, M.A., HOUCHINS, K.E. & MCMULLEN, M.D. (2002). Two Loci Exert Major Effects on Chlorogenic Acid Synthesis in Maize Silks. *Crop Science*, **42**, 1669–1678.
- BYRNE, P.F., MCMULLEN, M.D., WISEMAN, B.R., SNOOK, M.E., MUSKET, T.A., THEURI, J.M., WIDSTROM, N.W. & COE, E.H. (1998). Maize Silk Maysin Concentration and Corn Earworm Antibiosis: QTLs and Genetic Mechanisms. *Crop Science*, **38**.
- CAO, A., REID, L.M., BUTRÓN, A., MALVAR, R.A., SOUTO, X.C. & SANTIAGO, R. (2011). Role of Hydroxycinnamic Acids in the Infection of Maize Silks by FUSARIUM GRAMINEARUM Schwabe. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 1020–1026.
- CHANDER, S., GUO, Y., YANG, X., YAN, J., ZHANG, Y., SONG, T. & LI, J. (2008a). Genetic Dissection of Tocopherol Content and Composition in Maize Grain using Quantitative Trait Loci Analysis and the Candidate Gene Approach. *Molecular Breeding*, **22**, 353–365.
- CHANDER, S., MENG, Y., ZHANG, Y., YAN, J. & LI, J. (2008b). Comparison of Nutritional Traits Variability in Selected Eighty-Seven Inbreds from Chinese Maize (ZEA MAYS L.) Germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 6506–6511.
- DE CHAVES, M.A., REGINATTO, P., DA COSTA, B.S., DE PASCHOAL, R.I., TEIXEIRA, M.L. & FUENTEFRIA, A.M. (2022). Fungicide Resistance in FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex. *Current Microbiology*, **79**, 62.
- CHTIOUI, W., BALMAS, V., DELOGU, G., MIGHELI, Q. & OUFENSOU, S. (2022). Bioprospecting Phenols as Inhibitors of Trichothecene-Producing FUSARIUM: Sustainable Approaches to the Management of Wheat Pathogens. *Toxins*, **14**, 72.

- DE SANTIS, M.A., SOCCIO, M., LAUS, M.N. & FLAGELLA, Z. (2021). Influence of Drought and Salt Stress on Durum Wheat Grain Quality and Composition: A Review. *Plants*, **10**, 2599.
- DEL PONTE, E.M., MOREIRA, G.M., WARD, T.J., O'DONNELL, K., NICOLLI, C.P., MACHADO, F.J., DUFFECK, M.R., ALVES, K.S., TESSMANN, D.J., WAALWIJK, C., VAN DER LEE, T., ZHANG, H., CHULZE, S.N., STENGLEIN, S.A., PAN, D., VERO, S., VAILLANCOURT, L.J., SCHMALE, D.G., ESKER, P.D., MORETTI, A., LOGRIECO, A.F., KISTLER, H.C., BERGSTROM, G.C., VILJOEN, A., ROSE, L.J., VAN COLLER, G.J. & LEE, T. (2022). FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex: A Bibliographic Analysis and Web-Accessible Database for Global Mapping of Species and Trichothecene Toxin Chemotypes. *Phytopathology*, **112**, 741–751.
- DESAINT, H., AOUN, N., DESLANDES, L., VAILLEAU, F., ROUX, F. & BERTHOME, R. (2021). Fight Hard or Die Trying: When Plants Face Pathogens under Heat Stress. *The New Phytologist*, **229**, 712–734.
- DESJARDINS, A.E. & PROCTOR, R.H. (2011). Genetic Diversity and Trichothecene Chemotypes of the FUSARIUM GRAMINEARUM Clade Isolated from Maize in Nepal and Identification of a Putative New Lineage. *Fungal Biology*, **115**, 38–48.
- DIEPENBROCK, C.H., ILUT, D.C., MAGALLANES-LUNDBACK, M., KANDIANIS, C.B., LIPKA, A.E., BRADBURY, P.J., HOLLAND, J.B., HAMILTON, J.P., WOOLDRIDGE, E., VAILLANCOURT, B., GÓNGORA-CASTILLO, E., WALLACE, J.G., CEPELA, J., MATEOS-HERNANDEZ, M., OWENS, B.F., TIEDE, T., BUCKLER, E.S., ROCHEFORD, T., BUELL, C.R., GORE, M.A. & DELLAPENNA, D. (2021). Eleven Biosynthetic Genes Explain the Majority of Natural Variation in Carotenoid Levels in Maize Grain. *The Plant Cell*, **33**, 882–900.
- DIEPENBROCK, C.H., KANDIANIS, C.B., LIPKA, A.E., MAGALLANES-LUNDBACK, M., VAILLANCOURT, B., GÓNGORA-CASTILLO, E., WALLACE, J.G., CEPELA, J., MESBERG, A., BRADBURY, P.J., ILUT, D.C., MATEOS-HERNANDEZ, M., HAMILTON, J., OWENS, B.F., TIEDE, T., BUCKLER, E.S., ROCHEFORD, T., BUELL, C.R., GORE, M.A. & DELLAPENNA, D. (2017). Novel Loci Underlie Natural Variation in Vitamin E Levels in Maize Grain[OPEN]. *The Plant Cell*, **29**, 2374–2392.
- DOLL, N.M., GILLES, L.M., GÉRENTES, M.-F., RICHARD, C., JUST, J., FIERLEJ, Y., BORRELLI, V.M.G., GENDROT, G., INGRAM, G.C., ROGOWSKY, P.M. & WIDIEZ, T. (2019). Single and Multiple Gene Knockouts by CRISPR–Cas9 in Maize. *Plant Cell Reports*, **38**, 487–501.
- EL-GHORAB, A., EL-MASSRY, K.F. & SHIBAMOTO, T. (2007). Chemical Composition of the Volatile Extract and Antioxidant Activities of the Volatile and Nonvolatile Extracts of Egyptian Corn Silk (ZEA MAYS L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 9124–9127.
- ENRICO PÈ, M., GIANFRANCESCHI, L., TARAMINO, G., TARCHINI, R., ANGELINI, P., DANI, M. & BINELLI, G. (1993). Mapping Quantitative Trait Loci (QTLs) for Resistance to GIBBERELLA ZEA Infection in Maize. *Molecular and General Genetics MGG*, **241**, 11–16.
- ETCHEVERRY, M. (1998). Aflatoxin B1, Zearalenone and Deoxynivalenol Production by ASPERGILLUS PARASITICUS and FUSARIUM GRAMINEARUM in Interactive Cultures on Irradiated Corn Kernels. *Mycopathologia*, **142**, 37–42.
- FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
- FENG, C., YUAN, J., WANG, R., LIU, Y., BIRCHLER, J.A. & HAN, F. (2016). Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System. *Journal of Genetics and Genomics*, **43**, 37–43.

- FERNANDEZ-OROZCO, R., LI, L., HARFLETT, C., SHEWRY, P.R. & WARD, J.L. (2010). Effects of Environment and Genotype on Phenolic Acids in Wheat in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 9341–9352.
- FERRIGO, D., RAIOLA, A. & CAUSIN, R. (2016). FUSARIUM Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **21**, 627.
- FOROUD, N.A., PORDEL, R., GOYAL, R.K., RYABOVA, D., ERANTHODI, A., CHATTERTON, S. & KOVALCHUK, I. (2019). Chemical Activation of the Ethylene Signaling Pathway Promotes FUSARIUM GRAMINEARUM Resistance in Detached Wheat Heads. *Phytopathology*[®], **109**, 796–803.
- FOSS, K., PRZYBYŁOWICZ, K.E. & SAWICKI, T. (2022). Antioxidant Activity and Profile of Phenolic Compounds in Selected Herbal Plants. *Plant Foods for Human Nutrition*.
- France AgriMer. https://www.franceagrimer.fr/content/download/69189/document/NCO-DIA-CER-CSGC-MC_JUILLET-22.pdf
- GALE, L.R., HARRISON, S.A., WARD, T.J., O'DONNELL, K., MILUS, E.A., GALE, S.W. & KISTLER, H.C. (2011). Nivalenol-type Populations of FUSARIUM GRAMINEARUM and F. ASIATICUM are Prevalent on Wheat in Southern Louisiana. *Phytopathology*, **101**, 124–134.
- GALE, L.R., WARD, T.J., BALMAS, V. & KISTLER, H.C. (2007). Population Subdivision of FUSARIUM GRAMINEARUM SENSU STRICTO in the Upper Midwestern United States. *Phytopathology*, **97**, 1434–1439.
- GÁLVEZ RANILLA, L. (2020). The Application of Metabolomics for the Study of Cereal Corn (ZEA MAYS L.). *Metabolites*, **10**, 300.
- GAO, X., BRODHAGEN, M., ISAKEIT, T., BROWN, S.H., GÖBEL, C., BETRAN, J., FEUSSNER, I., KELLER, N.P. & KOLOMIETS, M.V. (2009). Inactivation of the Lipoxygenase ZmLOX3 Increases Susceptibility of Maize to ASPERGILLUS spp. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, **22**, 222–231.
- GARDINER, D.M., OSBORNE, S., KAZAN, K. & MANNERS, J.M.Y. 2009. (2009). Low pH Regulates the Production of Deoxynivalenol by FUSARIUM GRAMINEARUM. *Microbiology*, **155**, 3149–3156.
- GAREIS, M., BAUER, J., THIEM, J., PLANK, G., GRABLEY, S. & GEDEK, B. (1990). Cleavage of Zearalenone-Glycoside, a “Masked” Mycotoxin, during Digestion in Swine. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **37**, 236–240.
- GAUTHIER, L., ATANASOVA-PENICHON, V., CHÉREAU, S. & RICHARD-FORGET, F. (2015). Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against FUSARIUM GRAMINEARUM and Deoxynivalenol Accumulation. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 24839–24872.
- GHASEMZADEH, A. & GHASEMZADEH, N. (2011). Flavonoids and Phenolic Acids: Role and Biochemical Activity in Plants and Human. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 6697–6703.
- GLAZEBROOK, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 205–227.
- GOSWAMI, R.S. & KISTLER, H.C. (2004). Heading for Disaster: FUSARIUM GRAMINEARUM on Cereal Crops. *Molecular Plant Pathology*, **5**, 515–525.

Grain Fill Stages in Corn (Purdue University).

<https://www.agry.purdue.edu/ext/corn/news/timeless/GrainFill.html>

GRANT, M. & LAMB, C. (2006). Systemic Immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 414–420.

GUO, B.Z., ZHANG, Z.J., BUTRÓN, A., WIDSTROM, N.W., SNOOK, M.E., LYNCH, R.E. & PLAISTED, D. (2004). Lost P1 Allele in sh2 Sweet Corn: Quantitative Effects of p1 and a1 Genes on Concentrations of Maysin, Apimaysin, Methoxymaysin, and Chlorogenic Acid in Maize Silk. *Journal of Economic Entomology*, **97**, 2117–2126.

GXASHEKA, M., WANG, J., GUNYA, B., MBANJWA, V., TYASI, T.L., DLAMINI, P. & GAO, J. (2021). IN VITRO Effect of Some Commercial Fungicides on Mycelial Growth of FUSARIUM Species Causing Maize Ear Rot Disease in China. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **54**, 557–569.

HAN, S., MIEDANER, T., UTZ, H.F., SCHIPPRACK, W., SCHRAG, T.A. & MELCHINGER, A.E. (2017). Genomic Prediction and GWAS of GIBBERELLA Ear Rot Resistance Traits in Dent and Flint Lines of a Public Maize Breeding Program. *Euphytica*, **214**, 6.

HAN, S., UTZ, H.F., LIU, W., SCHRAG, T.A., STANGE, M., WÜRSCHUM, T., MIEDANER, T., BAUER, E., SCHÖN, C.-C. & MELCHINGER, A.E. (2016). Choice of Models for QTL Mapping With Multiple Families and Design of the Training Set for Prediction of FUSARIUM Resistance Traits in Maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **129**, 431–444.

HE, J., BOLAND, G. J. & ZHOU, T. (2009). Concurrent Selection for Microbial Suppression of FUSARIUM GRAMINEARUM, FUSARIUM Head Blight and Deoxynivalenol in Wheat. *Journal of Applied Microbiology*, **106**, 1805–1817.

HORVAT, D., ŠIMIĆ, G., DREZNER, G., LALIĆ, A., LEDENČAN, T., TUCAK, M., PLAVŠIĆ, H., ANDRIĆ, L. & ZDUNIĆ, Z. (2020). Phenolic Acid Profiles and Antioxidant Activity of Major Cereal Crops. *Antioxidants*, **9**, 527.

HOU, S., MA, J., CHENG, Y., WANG, H., SUN, J. & YAN, Y. (2021). The Toxicity Mechanisms of DON to Humans and Animals and Potential Biological Treatment Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–23.

INGLE, J., BEITZ, D. & HAGEMAN, R.H. (1965). Changes in Composition during Development and Maturation of Maize Seeds. *Plant Physiology*, **40**, 835–839.

JIANG, F. & DOUDNA, J.A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, **46**, 505–529.

JIANG, J., LIU, X., YIN, Y. & MA, Z. (2011). Involvement of a Velvet Protein FgVeA in the Regulation of Asexual Development, Lipid and Secondary Metabolisms and Virulence in FUSARIUM GRAMINEARUM. *PLOS ONE*, **6**, e28291.

JIAO, F., KAWAKAMI, A. & NAKAJIMA, T. (2008). Effects of Different Carbon Sources on Trichothecene Production and Tri Gene Expression by FUSARIUM GRAMINEARUM in Liquid Culture. *FEMS Microbiology Letters*, **285**, 212–219.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L., ÁLVAREZ-CORRAL, M., MUÑOZ-DORADO, M. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, I. (2008). Pterocarpan: Interesting Natural Products with Antifungal Activity and Other Biological Properties. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 125–154.

- JITTHAM, O., FU, X., XU, J., CHANDER, S., LI, J. & YANG, X. (2017). Genetic Dissection of Carotenoids in Maize Kernels Using High-density Single Nucleotide Polymorphism Markers in a Recombinant Inbred Line Population. *The Crop Journal*, **5**, 63–72.
- JONES, P. & VOGT, T. (2001). Glycosyltransferases in Secondary Plant Metabolism: Tranquilizers and Stimulant Controllers. *Planta*, **213**, 164–174.
- KEBEDE, A.Z., WOLDEMARIAM, T., REID, L.M. & HARRIS, L.J. (2016). Quantitative Trait Loci Mapping for GIBBERELLA Ear Rot Resistance and Associated Agronomic Traits using Genotyping-by-sequencing in Maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **129**, 17–29.
- KHALATBARI, A.A., JAAFAR, H.Z.E., KHALATBARI, A.M., MAHMOOD, M. & OTHMAN, R. (2015). Wild Type and *vte4* Mutant ARABIDOPSIS THALIANA Responses to Different Water Frequencies: Genetic Engineering Towards Stress Tolerance. *Journal of soil science and plant nutrition*, **15**, 991–1006.
- KLUGER, B., BUESCHL, C., LEMMENS, M., MICHLMAYR, H., MALACHOVA, A., KOUTNIK, A., MALOKU, I., BERTHILLER, F., ADAM, G., KRŠKA, R. & SCHUHMACHER, R. (2015). Biotransformation of the Mycotoxin Deoxynivalenol in FUSARIUM Resistant and Susceptible Near Isogenic Wheat Lines. *PLOS ONE*, **10**, e0119656.
- KOBAYASHI, N. & DELLAPENNA, D. (2008). Tocopherol Metabolism, Oxidation and Recycling under High Light Stress in ARABIDOPSIS. *The Plant Journal*, **55**, 607–618.
- KRNJAJA, V., STANKOVIĆ, S., OBRADOVIĆ, A., PETROVIĆ, T., MANDIĆ, V., BIJEIĆ, Z. & BOŽIĆ, M. (2018). Trichothecene Genotypes of FUSARIUM GRAMINEARUM Populations Isolated from Winter Wheat Crops in Serbia. *Toxins*, **10**, E460.
- KUHNEN, S., BERNARDI OGLIARI, J., DIAS, P.F., DA SILVA SANTOS, M., FERREIRA, A.G., BONHAM, C.C., WOOD, K.V. & MARASCHIN, M. (2010). Metabolic Fingerprint of Brazilian Maize Landraces Silk (Stigma/Styles) Using NMR Spectroscopy and Chemometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 2194–2200.
- KUNKEL, B.N. & BROOKS, D.M. (2002). Cross Talk Between Signaling Pathways in Pathogen Defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 325–331.
- KURILICH, A.C. & JUVIK, J.A. (1999). Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in ZEA MAYS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1948–1955.
- LEE, J., KIM, H., JEON, J.-J., KIM, H.-S., ZELLER, K.A., CARTER, L.L.A., LESLIE, J.F. & LEE, Y.-W. (2012). Population Structure of and Mycotoxin Production by FUSARIUM GRAMINEARUM from Maize in South Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 2161–2167.
- VAN DER LEE, T., ZHANG, H., VAN DIEPENINGEN, A. & WAALWIJK, C. (2015). Biogeography of FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex and Chemotypes: a Review. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, **32**, 453–460.
- LEGRAND, F., PICOT, A., COBO-DÍAZ, J.F., CHEN, W. & LE FLOCH, G. (2017). Challenges Facing the Biological Control Strategies for the Management of FUSARIUM Head Blight of Cereals Caused by F. GRAMINEARUM. *Biological Control*, **113**, 26–38.
- LEMMENS, M., SCHOLZ, U., BERTHILLER, F., DALL'ASTA, C., KOUTNIK, A., SCHUHMACHER, R., ADAM, G., BUERSTMAYR, H., MESTERHÁZY, Á., KRŠKA, R. & RUCKENBAUER, P. (2005). The Ability to Detoxify the

- Mycotoxin Deoxynivalenol Colocalizes With a Major Quantitative Trait Locus for FUSARIUM Head Blight Resistance in Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], **18**, 1318–1324.
- LESLIE, J.F., MORETTI, A., MESTERHÁZY, Á., AMEYE, M., AUDENAERT, K., SINGH, P.K., RICHARD-FORGET, F., CHULZE, S.N., PONTE, E.M.D., CHALA, A., BATTILANI, P. & LOGRIECO, A.F. (2021). Key Global Actions for Mycotoxin Management in Wheat and Other Small Grains. *Toxins*, **13**, 725.
- LI, G. & YEN, Y. (2008). Jasmonate and Ethylene Signaling Pathway May Mediate FUSARIUM Head Blight Resistance in Wheat. *Crop Science*, **48**, 1888–1896.
- LIM, J.G., KIM, G.Y., MO, C.Y., OH, K.M., KIM, G.S., YOO, H.C., HAM, H.H., KIM, Y.T., KIM, S.M. & KIM, M.S. (2017). Rapid and Nondestructive Discrimination of FUSARIUM ASIATICUM and FUSARIUM GRAMINEARUM in Hulled Barley (HORDEUM VULGARE L.) Using Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of Biosystems Engineering*, **42**, 301–313.
- LIU, H., DU, Y., CHU, H., SHIH, C.H., WONG, Y.W., WANG, M., CHU, I.K., TAO, Y. & LO, C. (2010). Molecular Dissection of the Pathogen-inducible 3-deoxyanthocyanidin Biosynthesis Pathway in Sorghum. *Plant & Cell Physiology*, **51**, 1173–1185.
- LIU, Y., GUO, Y., MA, C., ZHANG, D., WANG, C. & YANG, Q. (2016). Transcriptome Analysis of Maize Resistance to FUSARIUM GRAMINEARUM. *BMC Genomics*, **17**, 477.
- LUX, P.E., FREILING, M., STUETZ, W., VON TUCHER, S., CARLE, R., STEINGASS, C.B. & FRANK, J. (2020). (Poly)phenols, Carotenoids, and Tocochromanols in Corn (ZEA MAYS L.) Kernels As Affected by Phosphate Fertilization and Sowing Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **68**, 612–622.
- MA, J., QIU, D., PANG, Y., GAO, H., WANG, X. & QIN, Y. (2020). Diverse Roles of Tocopherols in Response to Abiotic and Biotic Stresses and Strategies for Genetic Biofortification in Plants. *Molecular Breeding*, **40**, 18.
- MAIER, F.J., MIEDANER, T., HADELER, B., FELK, A., SALOMON, S., LEMMENS, M., KASSNER, H. & SCHÄFER, W. (2006). Involvement of Trichothecenes in Fusarioses of Wheat, Barley and Maize Evaluated by Gene Disruption of the Trichodiene Synthase (Tri5) Gene in Three Field Isolates of Different Chemotype and Virulence. *Molecular Plant Pathology*, **7**, 449–461.
- 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. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, **25**, 431–439.
- MALBRÁN, I., MOURELOS, C.A., GIROTTI, J.R., BALATTI, P.A. & LORI, G.A. (2014). Toxigenic Capacity and Trichothecene Production by FUSARIUM GRAMINEARUM Isolates from Argentina and Their Relationship with Aggressiveness and Fungal Expansion in the Wheat Spike. *Phytopathology*, **104**, 357–364.
- MANGELSDORF, P.C., MACNEISH, R.S. & GALINAT, W.C. (1964). Domestication of Corn. *Science*.
- MARCHIOSI, R., DOS SANTOS, W.D., CONSTANTIN, R.P., DE LIMA, R.B., SOARES, A.R., FINGER-TEIXEIRA, A., MOTA, T.R., DE OLIVEIRA, D.M., FOLETTO-FELIPE, M. DE P., ABRAHÃO, J. & FERRARESE-FILHO, O. (2020). Biosynthesis and Metabolic Actions of Simple Phenolic Acids in Plants. *Phytochemistry Reviews*, **19**, 865–906.

- MARTIN, M., MIEDANER, T., DHILLON, B.S., UFERMANN, U., KESSEL, B., OUZUNOVA, M., SCHIPPRACK, W. & MELCHINGER, A.E. (2011). Colocalization of QTL for GIBBERELLA Ear Rot Resistance and Low Mycotoxin Contamination in Early European Maize. *Crop Science*, **51**, 1935–1945.
- MASOOD, A., DOGRA, J. V. V. & JHA, A. K. (1994). The Influence of Colouring and Pungent Agents of Red Chilli (CAPSICUM ANNUM) on Growth and Aflatoxin Production by ASPERGILLUS FLAVUS. *Letters in Applied Microbiology*, **18**, 184–186.
- MATARESE, F., SARROCCO, S., GRUBER, S., SEIDL-SEIBOTH, V. & VANNACCI, G. (2012). Biocontrol of FUSARIUM Head Blight: Interactions between Trichoderma and Mycotoxigenic FUSARIUM. *Microbiology (Reading, England)*, **158**, 98–106.
- MAUL, R., WARTH, B., KANT, J.-S., SCHEBB, N.H., KRŠKA, R., KOCH, M. & SULYOK, M. (2012). Investigation of the Hepatic Glucuronidation Pattern of the FUSARIUM Mycotoxin Deoxynivalenol in Various Species. *Chemical Research in Toxicology*, **25**, 2715–2717.
- MAURER, M.M., MEIN, J.R., CHAUDHURI, S.K. & CONSTANT, H.L. (2014). An Improved UHPLC-UV Method for Separation and Quantification of Carotenoids in Vegetable Crops. *Food Chemistry*, **165**, 475–482.
- MCCORMICK, S.P., STANLEY, A.M., STOVER, N.A. & ALEXANDER, N.J. (2011). Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, **3**, 802–814.
- MCMULLEN, M., JONES, R. & GALLENBERG, D. (1997). Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease*, **81**, 1340–1348.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., MANDIĆ, A.I., BANTIS, F., BÖHM, V., BERGE, G.I.A., BRNČIĆ, M., BYSTED, A., CANO, M.P., DIAS, M.G., ELGERSMA, A., FIKSELOVÁ, M., GARCÍA-ALONSO, J., GIUFFRIDA, D., GONÇALVES, V.S.S., HORNERO-MÉNDEZ, D., KLJAK, K., LAVELLI, V., MANGANARIS, G.A., MAPELLI-BRAHM, P., MAROUNEK, M., OLMEDILLA-ALONSO, B., PERIAGO-CASTÓN, M.J., PINTEA, A., SHEEHAN, J.J., TUMBAS ŠAPONJAC, V., VALŠÍKOVÁ-FREY, M., MEULEBROEK, L.V. & O'BRIEN, N. (2022). A Comprehensive Review on Carotenoids in Foods and Feeds: Status Quo, Applications, Patents, and Research Needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **62**, 1999–2049.
- MERHEJ, J., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. (2011). Regulation of Trichothecene Biosynthesis in FUSARIUM: Recent Advances and New Insights. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**, 519–528.
- MERHEJ, J., URBAN, M., DUFRESNE, M., HAMMOND-KOSACK, K.E., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. (2012). The Velvet Gene, FgVe1, Affects Fungal Development and Positively Regulates Trichothecene Biosynthesis and Pathogenicity in FUSARIUM GRAMINEARUM. *Molecular Plant Pathology*, **13**, 363–374.
- MESTERHÁZY, Á., BARTÓK, T., MIROCHA, C.G. & KOMORÓCZY, R. (1999). Nature of Wheat Resistance to FUSARIUM Head Blight and the Role of Deoxynivalenol for Breeding. *Plant Breeding*, **118**, 97–110.
- MIEDANER, T., BOEVEN, A.L.G.-C., GAIKPA, D.S., KISTNER, M.B. & GROTE, C.P. (2020). Genomics-Assisted Breeding for Quantitative Disease Resistances in Small-Grain Cereals and Maize. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 9717.
- MILLER, J.D. (2008). Mycotoxins in Small Grains and Maize: Old Problems, New Challenges. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **25**, 219–230.

- MILLER, S.S., REID, L.M., BUTLER, G., WINTER, S.P. & MCGOLDRICK, N.J. (2003). Long Chain Alkanes in Silk Extracts of Maize Genotypes with Varying Resistance to FUSARIUM GRAMINEARUM. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6702–6708.
- MILLER, S.S., REID, L.M. & HARRIS, L.J. (2007). Colonization of Maize Silks by FUSARIUM GRAMINEARUM, the Causative Organism of GIBBERELLA Ear Rot. *Canadian Journal of Botany*, **85**, 369–376.
- MONDS, R.D., CROMEY, M.G., LAUREN, D.R., DI MENNA, M. & MARSHALL, J. (2005). FUSARIUM GRAMINEARUM, F. CORTADERIAE and F. PSEUDOGAMINEARUM in New Zealand: Molecular Phylogenetic Analysis, Mycotoxin Chemotypes and Co-existence of Species. *Mycological Research*, **109**, 410–420.
- MONTIBUS, M., DUCOS, C., BONNIN-VERDAL, M.-N., BORMANN, J., PONTS, N., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. (2013). The bZIP Transcription Factor Fgap1 Mediates Oxidative Stress Response and Trichothecene Biosynthesis But Not Virulence in FUSARIUM GRAMINEARUM. *PLOS ONE*, **8**, e83377.
- MUELLER, D.S., WISE, K.A., SISSON, A.J., ALLEN, T.W., BERGSTROM, G.C., BISSONNETTE, K.M., BRADLEY, C.A., BYAMUKAMA, E., CHILVERS, M.I., COLLINS, A.A., ESKER, P.D., FASKE, T.R., FRISKOP, A.J., HAGAN, A.K., HEINIGER, R.W., HOLLIER, C.A., ISAKEIT, T., JACKSON-ZIEMS, T.A., JARDINE, D.J., KELLY, H.M., KLECZEWSKI, N.M., KOEHLER, A.M., KOENNING, S.R., MALVICK, D.K., MEHL, H.L., MEYER, R.F., PAUL, P.A., PELTIER, A.J., PRICE, P.P., ROBERTSON, A.E., ROTH, G.W., SIKORA, E.J., SMITH, D.L., TANDE, C.A., TELENKO, D.E.P., TENUTA, A.U., THIESSEN, L.D. & WIEBOLD, W.J. (2020). Corn Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2016 to 2019. *Plant Health Progress*, **21**, 238–247.
- MUHAMMAD ASLAM, M., WASEEM, M., JAKADA, B.H., OKAL, E.J., LEI, Z., SAQIB, H.S.A., YUAN, W., XU, W. & ZHANG, Q. (2022). Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 1084.
- MÜLLER, L., FRÖHLICH, K. & BÖHM, V. (2011). Comparative Antioxidant Activities of Carotenoids Measured by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), ABTS Bleaching Assay (α TEAC), DPPH Assay and Peroxyl Radical Scavenging Assay. *Food Chemistry*, **129**, 139–148.
- MUNKVOLD, G.P. (2003). Cultural and Genetic Approaches to Managing Mycotoxins in Maize. *Annual Review of Phytopathology*, **41**, 99–116.
- MUNNÉ-BOSCH, S. (2005). The Role of A-tocopherol in Plant Stress Tolerance. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 743–748.
- NALAM, V.J., ALAM, S., KEEREETAWEEP, J., VENABLES, B., BURDAN, D., LEE, H., TRICK, H.N., SAROWAR, S., MAKANDAR, R. & SHAH, J. (2015). Facilitation of FUSARIUM GRAMINEARUM Infection by 9-Lipoxygenases in Arabidopsis and Wheat. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, **28**, 1142–1152.
- NOBILI, C., D'ANGELI, S., ALTAMURA, M.M., SCALA, V., FABBRI, A.A., REVERBERI, M. & FANELLI, C. (2014). ROS and 9-oxylipins are Correlated with Deoxynivalenol Accumulation in the Germinating Caryopses of TRITICUM AESTIVUM after FUSARIUM GRAMINEARUM Infection. *European Journal of Plant Pathology*, **139**, 429–444.
- NORTON, R.A. (1997). Effect of Carotenoids on Aflatoxin B(1) Synthesis by ASPERGILLUS FLAVUS. *Phytopathology*, **87**, 814–821.

- NORTON, R.A. (1999). Inhibition of Aflatoxin B(1) biosynthesis in *ASPERGILLUS FLAVUS* by Anthocyanidins and Related Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1230–1235.
- OECD. (2021). *Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO (Édition 2021)*. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OLDENBURG, E. & SCHITTENHELM, S. (2012). Effect of Plant Water Deficit on the Deoxynivalenol Concentration in *FUSARIUM*-infected Maize Kernels. *Mycotoxin Research*, **28**, 229–236.
- ORTIZ-MONASTERIO, J.I., PALACIOS-ROJAS, N., MENG, E., PIXLEY, K., TRETOWAN, R. & PEÑA, R.J. (2007). Enhancing the Mineral and Vitamin Content of Wheat and Maize Through Plant Breeding. *Journal of Cereal Science*, **46**, 293–307.
- OSMAN, M., HE, X., BENEDETTELLI, S. & SINGH, P.K. (2016). Trichothecene Genotypes of *FUSARIUM GRAMINEARUM* Species Complex and *F. CROOKWELLEENSE* Isolates from Mexican Cereals. *Journal of Plant Pathology*, **98**, 331–336.
- PALAZZINI, J.M., GROENENBOOM-DE HAAS, B.H., TORRES, A.M., KÖHL, J. & CHULZE, S.N. (2013). Biocontrol and Population Dynamics of *FUSARIUM* spp. on Wheat Stubble in Argentina. *Plant Pathology*, **62**, 859–866.
- PALAZZINI, J.M., YERKOVICH, N., ALBERIONE, E., CHIOTTA, M. & CHULZE, S.N. (2017). An Integrated Dual Strategy to Control *FUSARIUM GRAMINEARUM SENSU STRICTO* by the Biocontrol Agent *STREPTOMYCES* sp. RC 87B under Field Conditions. *Plant Gene*, **9**, 13–18.
- PANDEY, P., IRULAPPAN, V., BAGAVATHIANNAN, M.V. & SENTHIL-KUMAR, M. (2017). Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science*, **8**.
- PARKER, N.S., ANDERSON, N.R., RICHMOND, D.S., LONG, E.Y., WISE, K.A. & KRUPKE, C.H. (2017). Larval Western Bean Cutworm Feeding Damage Encourages the Development of *GIBBERELLA* Ear Rot on Field Corn. *Pest Management Science*, **73**, 546–553.
- PARRY, D.W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. (1995). *FUSARIUM* Ear Blight (Scab) in Small Grain Cereals—a Review. *Plant Pathology*, **44**, 207–238.
- PERINCHERRY, L., LALAK-KAŃCZUGOWSKA, J. & STĘPIEŃ, Ł. (2019). *FUSARIUM*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins*, **11**, E664.
- PESTKA, J.J. (2010). Deoxynivalenol: Mechanisms of Action, Human Exposure, and Toxicological Relevance. *Archives of Toxicology*, **84**, 663–679.
- PICOT, A., ATANASOVA-PÉNICHON, V., PONS, S., MARCHEGAY, G., BARREAU, C., PINSON-GADAIS, L., ROUCOLLE, J., DAVEAU, F., CARON, D. & RICHARD-FORGET, F. (2013). Maize Kernel Antioxidants and Their Potential Involvement in *Fusarium* Ear Rot Resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 3389–3395.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BARREAU, C., RICHARD-FORGET, F. & OUELLET, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and Catalase Treatments Interfere with Tri Genes Expression in Liquid Cultures of *FUSARIUM GRAMINEARUM*. *FEBS Letters*, **581**, 443–447.

- POPOVSKI, S. & CELAR, F. (2013). The Impact of Environmental Factors on the Infection of Cereals with FUSARIUM Species and Mycotoxin Production - A review. *Acta Agriculturae Slovenica*, **101**, 105–116.
- POWELL, A.J. & VUJANOVIC, V. (2021). Evolution of FUSARIUM Head Blight Management in Wheat: Scientific Perspectives on Biological Control Agents and Crop Genotypes Protocooperation. *Applied Sciences*, **11**, 8960.
- PURI, K.D. & ZHONG, S. (2010). The 3ADON Population of FUSARIUM GRAMINEARUM Found in North Dakota is More Aggressive and Produces a Higher Level of DON than the Prevalent 15ADON Population in Spring Wheat. *Phytopathology*, **100**, 1007–1014.
- QIU, M., WANG, Y., SUN, L., DENG, Q. & ZHAO, J. (2021). Fatty Acids and Oxylipins as Antifungal and Anti-Mycotoxin Agents in Food: A Review. *Toxins*, **13**, 852.
- RAMEL, F., BIRTIC, S., CUINE, S., TRIANTAPHYLIDES, C., RAVANAT, J.-L. & HAVAUX, M. (2012). Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. *Plant Physiology*, **158**, 1267–1278.
- RANCUREL, C., VAN TRAN, T., ELIE, C. & HILLIOU, F. (2019). SATQPCR: Website for Statistical Analysis of Real-time Quantitative PCR Data. *Molecular and Cellular Probes*, **46**, 101418.
- REID, L.M., MATHER, D.E., ARNASON, J.T., HAMILTON, R.I. & BOLTON, A.T. (1992a). Changes in Phenolic Constituents of Maize Silk Infected with FUSARIUM GRAMINEARUM. *Canadian Journal of Botany*, **70**, 1697–1702.
- REID, L.M., MATHER, D.E., HAMILTON, R.I. & BOLTON, A.T. (1992b). Genotypic Differences in the Resistance of Maize Silk to FUSARIUM GRAMINEARUM. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **14**, 211–214.
- REID, L.M., NICOL, R.W., OUELLET, T., SAVARD, M., MILLER, J.D., YOUNG, J.C., STEWART, D.W. & SCHAAFSSMA, A.W. (1999). Interaction of FUSARIUM GRAMINEARUM and F. MONILIFORME in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation. *Phytopathology*[®], **89**, 1028–1037.
- REID, L.M. & SINHA, R.C. (1998). Maize Maturity and the Development of GIBBERELLA Ear Rot Symptoms and Deoxynivalenol after Inoculation. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 147–154.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A., NAVARRO, L., BARI, R. & JONES, J.D. (2007). Pathological Hormone Imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 372–379.
- ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F.M. (2005). Effects of Trichothecene Mycotoxins on Eukaryotic Cells: A Review. *Food Additives & Contaminants*, **22**, 369–378.
- RODRÍGUEZ-SALINAS, P.A., ZAVALA-GARCÍA, F., URÍAS-ORONA, V., MUY-RANGEL, D., HEREDIA, J.B. & NIÑO-MEDINA, G. (2020). Chromatic, Nutritional and Nutraceutical Properties of Pigmented Native Maize (ZEA MAYS L.) Genotypes from the Northeast of Mexico. *Arabian Journal for Science and Engineering*, **45**, 95–112.
- SALINAS-MORENO, Y., GARCIA-SALINAS, C., RAMIREZ-DIAZ, J.L., TORRE, I.A. LA, SALINAS-MORENO, Y., GARCIA-SALINAS, C., RAMIREZ-DIAZ, J.L. & TORRE, I.A. LA. (2017). Phenolic Compounds in Maize Grains and Its Nixtamalized Products. *IntechOpen*.
- SÁNCHEZ GONZÁLEZ, J. DE J., RUIZ CORRAL, J.A., GARCÍA, G.M., OJEDA, G.R., LARIOS, L.D. LA C., HOLLAND, J.B.,

- MEDRANO, R.M. & GARCÍA ROMERO, G.E. (2018). Ecogeography of Teosinte. *PLoS ONE*, **13**.
- SANTOS, L., KASPER, R., GIL-SERNA, J., MARÍN, S., SANCHIS, V. & RAMOS, A.J. (2010). Effect of Capsicum Carotenoids on Growth and Ochratoxin A Production by Chilli and Paprika ASPERGILLUS spp. Isolates. *International Journal of Food Microbiology*, **142**, 354–359.
- SARAVANAKUMAR, K., LI, Y., YU, C., WANG, Q.-Q., WANG, M., SUN, J., GAO, J.-X. & CHEN, J. (2017). Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of Fusarium Stalk rot. *Scientific Reports*, **7**, 1771.
- SAVIGNAC, J.-M., ATANASOVA, V., CHÉREAU, S., ORTÉGA, V. & RICHARD-FORGET, F. (2022). Role of Tocochromanols in Tolerance of Cereals to Biotic Stresses: Specific Focus on Pathogenic and Toxigenic Fungal Species. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 9303.
- SCARDACI, S.C. & WEBSTER, R.K. (1982). Common Root Rot of Cereals in California. *Plant Disease*, **66**, 31.
- SCHAAF SMA, A.W. & HOOKER, D.C. (2007). Climatic Models to Predict Occurrence of FUSARIUM Toxins in Wheat and Maize. *International Journal of Food Microbiology*, **119**, 116–125.
- SCHMALE, D.G., WOOD-JONES, A.K., COWGER, C., BERGSTROM, G.C. & ARELLANO, C. (2011). Trichothecene Genotypes of GIBBERELLA ZEA from Winter Wheat Fields in the Eastern USA. *Plant Pathology*, **60**, 909–917.
- SCOZ, L.B., ASTOLFI, P., REARTES, D.S., SCHMALE III, D.G., MORAES, M.G. & DEL PONTE, E.M. (2009). Trichothecene Mycotoxin Genotypes of FUSARIUM GRAMINEARUM SENSU STRICTO and FUSARIUM MERIDIONALE in Wheat from Southern Brazil. *Plant Pathology*, **58**, 344–351.
- SHI, J., HABBEN, J.E., ARCHIBALD, R.L., DRUMMOND, B.J., CHAMBERLIN, M.A., WILLIAMS, R.W., LAFITTE, H.R. & WEERS, B.P. (2015). Overexpression of ARGOS Genes Modifies Plant Sensitivity to Ethylene, Leading to Improved Drought Tolerance in Both Arabidopsis and Maize. *Plant Physiology*, **169**, 266–282.
- SHIGENAGA, A.M. & ARGUESO, C.T. (2016). No Hormone to Rule Them All: Interactions of Plant Hormones During the Responses of Plants to Pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **56**, 174–189.
- SMITH, J.L., LIMAY-RIOS, V., HOOKER, D.C. & SCHAAF SMA, A.W. (2018). FUSARIUM GRAMINEARUM Mycotoxins in Maize Associated With STRIACOSTE ALBICOSTA (Lepidoptera: Noctuidae) Injury. *Journal of Economic Entomology*, **111**, 1227–1242.
- SOBROVA, P., ADAM, V., VASATKOVA, A., BEKLOVA, M., ZEMAN, L. & KIZEK, R. (2010). Deoxynivalenol and its Toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, **3**, 94–99.
- Source Arvalis Institut du végétal. <https://www.arvalis.fr/infos-techniques/tous-les-contenus>
- Source maisculturedurable. <https://www.maisculturedurable.com/patrimoine/la-physiologie-du-mais>
- Source Syngenta. (2017). <https://www.syngenta.fr/cultures/mais/dossier-implantation-du-mais/article-protection-semences/impact-fusarium-groupe-liseola-sur-mais>
- SRIVASTAVA, S. & MISHRA, H.N. (2022). Expeditious Detection of FUSARIUM GRAMINEARUM Infection in Rice by FTNIR using Hierarchical Cluster Analysis. *Food Chemistry Advances*, **1**, 100140.

- SUGA, H., KARUGIA, G.W., WARD, T., GALE, L.R., TOMIMURA, K., NAKAJIMA, T., MIYASAKA, A., KOIZUMI, S., KAGEYAMA, K. & HYAKUMACHI, M. (2008). Molecular Characterization of the FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex in Japan. *Phytopathology*, **98**, 159–166.
- SUKALOVIĆ, V.H.-T., VELJOVIĆ-JOVANOVIĆ, S., MAKSIMOVIĆ, J.D., MAKSIMOVIĆ, V. & PAJIĆ, Z. (2010). Characterisation of Phenol Oxidase and Peroxidase from Maize Silk. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, **12**, 406–413.
- SULEIMAN, R., ROSENTRATER, K. & BERN, C. (2013). Effects of Deterioration Parameters on Storage of Maize. *2013 Kansas City, Missouri, July 21 - July 24, 2013. ASABE Paper No. 131593351*.
- SUN, X., MA, L., LUX, P.E., WANG, X., STUETZ, W., FRANK, J. & LIANG, J. (2022). The Distribution of Phosphorus, Carotenoids and Tocochromanols in Grains of Four Chinese Maize (ZEA MAYS L.) Varieties. *Food Chemistry*, **367**, 130725.
- SUN, Y., XIAO, J., JIA, X., KE, P., HE, L., CAO, A., WANG, H., WU, Y., GAO, X. & WANG, X. (2016). The Role of Wheat Jasmonic Acid and Ethylene Pathways in Response to FUSARIUM GRAMINEARUM Infection. *Plant Growth Regulation*, **80**, 69–77.
- SUTTON, J.C., BALIKO, W. & LIU, H.J. (1980). Fungal Colonization and Zearalenone Accumulation in Maize Ears Injured by Birds. *Canadian Journal of Plant Science*, **60**, 453–461.
- TAN, D.C., FLEMATTI, G.R., GHISALBERTI, E.L., SIVASITHAMPARAM, K., CHAKRABORTY, S., OBANOR, F., JAYASENA, K. & BARBETTI, M.J. (2012). Mycotoxins Produced by FUSARIUM spp. Associated with FUSARIUM Head Blight of Wheat in Western Australia. *Mycotoxin Research*, **28**, 89–96.
- TANAKA, R., WU, D., LI, X., TIBBS-CORTES, L.E., WOOD, J.C., MAGALLANES-LUNDBACK, M., BORNOWSKI, N., HAMILTON, J.P., VAILLANCOURT, B., LI, X., DEASON, N.T., SCHOENBAUM, G.R., BUELL, C.R., DELLAPENNA, D., YU, J. & GORE, M.A. (2022). Leveraging Prior Biological Knowledge Improves Prediction of Tocochromanols in Maize Grain. *The Plant Genome*.
- TENAILLON, M.I. & CHARCOSSET, A. (2011). A European Perspective on Maize History. *Comptes Rendus Biologies*, **334**, 221–228.
- THOMA, I., LOEFFLER, C., SINHA, A.K., GUPTA, M., KRISCHKE, M., STEFFAN, B., ROITSCH, T. & MUELLER, M.J. (2003). Cyclopentenone Isoprostanes Induced by Reactive Oxygen Species Trigger Defense Gene Activation and Phytoalexin Accumulation in Plants. *The Plant Journal*, **34**, 363–375.
- THOMPSON, M.E.H. & RAIZADA, M.N. (2018). Fungal Pathogens of Maize Gaining Free Passage Along the Silk Road. *Pathogens*, **7**, 81.
- TREHAN, S., SINGH, N. & KAUR, A. (2018). Characteristics of White, Yellow, Purple Corn Accessions: Phenolic Profile, Textural, Rheological Properties and Muffin Making Potential. *Journal of Food Science and Technology*, **55**, 2334–2343.
- TRONO, D. (2019). Carotenoids in Cereal Food Crops: Composition and Retention throughout Grain Storage and Food Processing. *Plants*, **8**, 551.
- UMPIÉRREZ-FAILACHE, M., GARMENDIA, G., PEREYRA, S., RODRÍGUEZ-HARALAMBIDES, A., WARD, T.J. & VERO, S. (2013). Regional Differences in Species Composition and Toxigenic Potential among FUSARIUM Head Blight Isolates from Uruguay Indicate a Risk of Nivalenol Contamination in New Wheat Production Areas. *International Journal of Food Microbiology*, **166**, 135–140.

- VAN HUNG, P. (2016). Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**, 25–35.
- VELA-CORCÍA, D., ROMERO, D., DE VICENTE, A. & PÉREZ-GARCÍA, A. (2018). Analysis of β -tubulin-Carbendazim Interaction Reveals that Binding Site for MBC Fungicides Does not Include Residues Involved in Fungicide Resistance. *Scientific Reports*, **8**, 7161.
- VELLUTI, A., MARIN, S., GONZALEZ, R., J RAMOS, A. & SANCHIS, V. (2001). Fumonisin B1, Zearalenone and Deoxynivalenol Production by FUSARIUM MONILIFORME, F PROLIFERATUM and F GRAMINEARUM in Mixed Cultures on Irradiated Maize Kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 88–94.
- VENSKE, E., DOS SANTOS, R.S., FARIAS, D. DA R., ROTHER, V., DA MAIA, L.C., PEGORARO, C. & COSTA DE OLIVEIRA, A. (2019). Meta-Analysis of the QTLome of FUSARIUM Head Blight Resistance in Bread Wheat: Refining the Current Puzzle. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 727.
- WALTER, S., NICHOLSON, P. & DOOHAN, F.M. (2010). Action and Reaction of Host and Pathogen During FUSARIUM Head Blight Disease. *New Phytologist*, **185**, 54–66.
- WANG, L., LI, Q., LIU, Z., SURENDRA, A., PAN, Y., LI, Y., ZAHARIA, L.I., OUELLET, T. & FOBERT, P.R. (2018). Integrated Transcriptome and Hormone Profiling Highlight the Role of Multiple Phytohormone Pathways in Wheat Resistance Against FUSARIUM Head Blight. *PLOS ONE*, **13**.
- WANG, Y., LIU, Q., FAN, S., YANG, X., MING, L., WANG, H. & LIU, J. (2019). Rapid Analysis and Characterization of Multiple Constituents of Corn Silk Aqueous Extract using Ultra-high-Performance Liquid Chromatography Combined with Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry. *Journal of Separation Science*, **42**, 3054–3066.
- WANG, Y., MOSTAFA, S., ZENG, W. & JIN, B. (2021). Function and Mechanism of Jasmonic Acid in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 8568.
- WANG, Y., ZHOU, Z., GAO, J., WU, Y., XIA, Z., ZHANG, H. & WU, J. (2016). The Mechanisms of Maize Resistance to FUSARIUM VERTICILLIOIDES by Comprehensive Analysis of RNA-seq Data. *Frontiers in Plant Science*, **7**.
- WAŚKIEWICZ, A., MUZOLF-PANEK, M., STĘPIEŃ, Ł., CZEMBOR, E., UWINEZA, P.A., GÓRNAŚ, P. & BRYŁA, M. (2022). Variation in Tocochromanols Level and Mycotoxins Content in Sweet Maize Cultivars after Inoculation with FUSARIUM VERTICILLIOIDES and F. PROLIFERATUM. *Foods*, **11**, 2781.
- WEN, J., SHEN, Y., XING, Y., WANG, Z., HAN, S., LI, S., YANG, C., HAO, D. & ZHANG, Y. (2021). QTL Mapping of FUSARIUM Ear Rot Resistance in Maize. *Plant Disease*, **105**, 558–565.
- WILSON, W.W., MCKEE, G., NGANJE, W., DAHL, B. & BANGSUND, D. (eds). (2017). Economic Impact of USWBSI's Scab Initiative to Reduce FHB. *Agribusiness & Applied Economics* 774.
- WONG, J.C., LAMBERT, R.J., WURTZEL, E.T. & ROCHEFORD, T.R. (2004). QTL and Candidate Genes Phytoene Synthase and ζ -carotene Desaturase Associated with the Accumulation of Carotenoids in Maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**, 349–359.
- XU, X., NICHOLSON, P. & RITIENI, A. (2007). Effects of Fungal Interactions among FUSARIUM Head Blight Pathogens on Disease Development and Mycotoxin Accumulation. *International Journal of Food Microbiology*, **119**, 67–71.

- YE, J., GUO, Y., ZHANG, D., ZHANG, N., WANG, C. & XU, M. (2013). Cytological and Molecular Characterization of Quantitative Trait Locus qRfg1, Which Confers Resistance to GIBBERELLA Stalk Rot in Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], **26**, 1417–1428.
- YI, S.-Y., SHIRASU, K., MOON, J.S., LEE, S.-G. & KWON, S.-Y. (2014). The Activated SA and JA Signaling Pathways Have an Influence on flg22-Triggered Oxidative Burst and Callose Deposition. *PLOS ONE*, **9**.
- YLI-MATTILA, T., GAGKAEVA, T., WARD, T.J., AOKI, T., KISTLER, H.C. & O'DONNELL, K. (2009). A Novel Asian Clade within the FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex Includes a Newly Discovered Cereal Head Blight Pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, **101**, 841–852.
- YU, C., LIU, X., ZHANG, X., ZHANG, M., GU, Y., ALI, Q., MOHAMED, M.S.R., XU, J., SHI, J., GAO, X., WU, H. & GU, Q. (2021). Mycosubtilin Produced by BACILLUS SUBTILIS ATCC6633 Inhibits Growth and Mycotoxin Biosynthesis of FUSARIUM GRAMINEARUM and FUSARIUM VERTICILLIOIDES. *Toxins*, **13**, 791.
- YUAN, G., HE, X., LI, H., XIANG, K., LIU, L., ZOU, C., LIN, H., WU, J., ZHANG, Z. & PAN, G. (2020). Transcriptomic Responses in Resistant and Susceptible Maize Infected with FUSARIUM GRAMINEARUM. *The Crop Journal*, **8**, 153–163.
- ZHAI, S., XIA, X. & HE, Z. (2016). Carotenoids in Staple Cereals: Metabolism, Regulation, and Genetic Manipulation. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1197.
- ZHANG, H., LEE, T.V. DER, WAALWIJK, C., CHEN, W., XU, J., XU, J., ZHANG, Y. & FENG, J. (2012). Population Analysis of the FUSARIUM GRAMINEARUM Species Complex from Wheat in China Show a Shift to More Aggressive Isolates. *PLOS ONE*, **7**.
- ZHANG, P., WANG, Y., ZHANG, J., MADDOCK, S., SNOOK, M. & PETERSON, T. (2003). A Maize QTL for Silk Maysin Levels Contains Duplicated Myb-homologous Genes which Jointly Regulate Flavone Biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, **52**, 1–15.
- 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**.
- ZHENG, Q., HOU, R., JUANYU, ZHANG, MA, J., WU, Z., WANG, G., WANG, C. & XU, J.-R. (2013). The MAT Locus Genes Play Different Roles in Sexual Reproduction and Pathogenesis in FUSARIUM GRAMINEARUM. *PLOS ONE*, **8**, e66980.
- ZHU, Y., HASSAN, Y.I., WATTS, C. & ZHOU, T. (2016). Innovative Technologies for the Mitigation of Mycotoxins in Animal Feed and Ingredients—A Review of Recent Patents. *Animal Feed Science and Technology*, **216**, 19–29.
- ZURAK, D., GRBEŠA, D., DUVNJAK, M., KIŠ, G., MEĐIMUREC, T. & KLJAK, K. (2021). Carotenoid Content and Bioaccessibility in Commercial Maize Hybrids. *Agriculture*, **11**, 586.

Titre : Identification de marqueurs biochimiques de résistance des soies et des grains à la fusariose de type GER (*Gibberella* Ear Rot) chez le maïs

Résumé :

Parmi les nombreux agents pathogènes fongiques susceptibles d'infecter les épis de maïs, les espèces appartenant au genre *Fusarium*, dont *Fusarium graminearum*, sont particulièrement préoccupantes. La fusariose de l'épi (ou *Gibberella* Ear Rot) est susceptible d'induire des pertes de rendement considérables et est fréquemment associée à une contamination des grains par la mycotoxine deoxynivalénol/DON. La sélection génétique représente une stratégie très prometteuse pour espérer pouvoir garantir des niveaux minimaux de contamination des récoltes par le DON. Cette résistance est polygénique, reposant sur plusieurs composantes dont la résistance à l'infection initiale qui chez le maïs peut être associée à la résistance des soies, la résistance à la propagation dans l'épi ainsi que la résistance à l'accumulation de DON. La composition métabolomique des soies et des antioxydants lipophiles des grains a été explorée et mise en relation avec le niveau de sensibilité à GER. Cette étude a permis de suggérer la contribution de plusieurs phénylpropanoïdes contenus dans les soies et de caroténoïdes présents dans les grains dans la sensibilité des maïs à *F. graminearum*. De plus, l'analyse *in vitro* de l'effet des caroténoïdes a montré leur capacité à inhiber la production de toxines. Cette activité inhibitrice est liée à un contrôle négatif de l'expression des gènes de biosynthèse du DON. Elle s'accompagne d'une modulation conséquente de l'expression de plusieurs gènes fongiques impliqués dans l'homéostasie redox. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont ainsi mis en évidence plusieurs potentiels marqueurs biochimiques de sensibilité des maïs à la fusariose de l'épi et ont souligné la puissance des outils de métabolomique comme de nouveaux outils de phénotypage et de sélection à haut débit.

Mots clés : *Fusarium graminearum*, *Zea mays*, Tocochromanols, Caroténoïdes, Soies, Composés phénoliques, Trichothécènes de type B

Unité de recherche

[Mycologie et Sécurité des Aliments, UR1264, 71 Av. Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon]

Title : Search for biochemical markers related to the resistance of the silks and maize grains to GER (*Gibberella* Ear Rot)

Abstract :

Among the numerous fungal pathogens likely to infect maize, species belonging to the genus *Fusarium*, including *Fusarium graminearum*, are of particular concern. Indeed, these species, responsible for the fungal disease *Gibberella* ear rot (GER), cause significant yield reduction and contamination of kernels with the deoxynivalenol mycotoxin. Plant breeding strategies are among the most promising approaches to guarantee low levels of mycotoxins in harvests. Maize resistance to GER is a highly complex quantitative trait controlled by multiple genes that can be split into three main components: resistance that operates against initial infection and is related to silk resistance, resistance against the spread of the pathogen within the cob, resistance against DON accumulation. The metabolomic composition of silks and in lipophilic antioxidants of kernels have been explored and linked with susceptibility level of maize to GER. This allowed us to suggest the contribution of a wide variety of phenylpropanoids occurring in silks and of carotenoids present in mature kernels to maize susceptibility to *F. graminearum*. In addition, *in vitro* studies have allowed demonstrating the capacity of carotenoids to inhibit the production of DON. . The antimycotoxin activity of carotenoids was shown to be linked to an inhibition of the expression of the *tri* biosynthetic genes and a modulation of the expression of antioxidant genes involved in redox homeostasis. The results delivered by this thesis have allowed proposing candidate biochemical markers associated with maize susceptibility to GER and have highlighted the power of metabolomic tools as new tools of phenotyping and high throughput selection.

Keywords : [3 minimum] *Fusarium graminearum*, *Zea mays*, Tocochromanols, Carotenoids, Silks, Phenolic compounds, Type B trichothecenes

Unité de recherche

[Mycologie et Sécurité des Aliments, UR1264, 71 Av. Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon]