



**HAL**  
open science

# Immunisation des plantes par les éliciteurs biologiques : étude des mécanismes et caractérisation des molécules

Manel Chaouachi

► **To cite this version:**

Manel Chaouachi. Immunisation des plantes par les éliciteurs biologiques : étude des mécanismes et caractérisation des molécules. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université de Tunis El Manar, 2021. Français. NNT : 2021INPT0036 . tel-04170601

**HAL Id: tel-04170601**

**<https://theses.hal.science/tel-04170601v1>**

Submitted on 25 Jul 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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Ecologie Fonctionnelle

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme MANEL CHAOUACHI

le mardi 30 mars 2021

**Titre :**

Immunsation des plantes par les éliciteurs biologiques: Etude des  
mécanismes et caractérisation des molécules

---

**Ecole doctorale :**

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDU2E)

**Unité de recherche :**

Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement ( LEFE)

**Directeurs de Thèse :**

M. LAURENT GENTZBITTEL

M. NACEUR DJEBALI

**Rapporteurs :**

M. MARC BARDIN, INRA AVIGNON

M. MONCEF MRABET, CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE BORJ CEDRIA

**Membres du jury :**

MME MAHA MEZGHANI-KHEMAKHEM, FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS, Présidente

M. LAURENT GENTZBITTEL, TOULOUSE INP, Membre

MME ANISSA LOUNES-HADJ SAHRAOUI, IUT DU LITTORAL CÔTE D'OPALE, Membre

MME CECILE BEN, TOULOUSE INP, Invitée

M. NACEUR DJEBALI, CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE BORJ CEDRIA, Membre

M. SOPHIEN KAMOUN, UNIVERSITY OF EAST ANGLIA NORWICH, Invité

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet PHC-UTIQUE intitulé « Immunisation des plantes par les éliciteurs biologiques : Etude des mécanismes et caractérisation des molécules » entre le laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR5245 CNRS/UPS/INPT (ECOLAB) (France) et le Laboratoire des Substances Bioactives (LSBA) au Centre de Biotechnologie Borj Cedria (CBBC) (Tunisie).

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mes directeurs de thèse, Dr. Naceur Djébali, Maître de conférences au « Laboratoire des Substances Bioactives » et Pr. Laurent Gentzbittel au « Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement », pour leur confiance, implication et leurs conseils qui m'ont permis de progresser durant ces cinq ans de thèse.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance et mon extrême gratitude à mon co-encadrante Dr. Cécile Ben, maître de conférences au « Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement » et chef du projet PHC-UTIQUE coté française pour son investissement à fond dans le projet, sa grande disponibilité, son aide et ses conseils qui m'ont permis d'améliorer mes compétences tout au long de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus distingués à Pr. Marc Bardin, directeur de recherche à l'Unité de Recherche Pathologie Végétale, INRAE-PACA, Avignon, France, et Dr. Moncef Mrabet, maître de conférence au laboratoire des Légumineuses au centre de Biotechnologie de Borj Cedria, Tunisie, pour avoir leur intérêt à ce travail et d'avoir accepté de l'évaluer.

Je tiens fortement à remercier Pr. Maha Mezghani-Khemakhem, professeur à la faculté des Sciences de Tunis et Pr. Anissa Lounes - Hadj Sahraoui, professeur à ULCO- UCEIV (Calais) de m'avoir honorée par leur présence parmi les membres du jury. Je suis très reconnaissante d'avoir porté intérêt à ce travail et qu'elles ont accepté aimablement de juger cette thèse.

Je suis infiniment sensible et reconnaissante à l'honneur que Pr. Sophien Kamoun, professeur au « The Sainsbury Laboratory » me fait en acceptant de siéger comme invité dans le jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes chaleureux remerciements à Pr. Franck Gilbert et Pr. Régis Cereghino, responsables successifs du laboratoire EcoLab pour leur accueil au sein du Laboratoire.

Je tiens à remercier également Pr. Ferid Limam, Dr. Salem Elkahoui et Dr. Olfa Tabbenne responsables successifs du laboratoire LSBA pour leur accueil au sein de leur unité de recherche.

Cette thèse a nécessité tout au long de sa durée de réalisation l'aide et le soutien de plusieurs personnes :

Je veux remercier tout particulièrement et témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant la thèse au sein du CBBC

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Ghassen Abid, maître assistant au « Laboratoire des Légumineuses (LL) », pour son aide dans la partie moléculaire et ses conseils précis et enrichissants.

Je tiens à monter ma gratitude à Dr. Mounawer Badri, Maître de conférences au Laboratoire des Plantes Extrêmophiles (LPE) pour son aide et ses encouragements.

Je tiens également à remercier Dr. Thouraya Hamouda et Dr. Faouzia Haddada, maîtres assistantes au LSBA pour leur gentillesse, leur conseils et leurs encouragements tout au long de la durée de la thèse.

Je ne manque pas de remercier aussi Pr. Mhadhbi Haythem, responsable du LL pour sa gentillesse et son accueil au sein du laboratoire.

J'exprime également ma gratitude à l'égard de l'ensemble du personnel des laboratoires LSBA et LL et plus particulièrement Imen Ben Slimen, Selim Jallouli, Souad Oueslati, Nadia Fares, Mahdi Fatnassi, Rim Essid, Fathi Barhoumi, Saber Rezgui, Mme Fatma et Mme Jamila pour leur précieuse aide ainsi que leur sympathie qui a favorisé mon intégration dans le centre.

Je veux remercier également et témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant la thèse au sein du Ecolab :

Je tiens à monter ma gratitude à Pr. Martina Rickaouer pour son aide et ses conseils précis et enrichissants durant les réunions de l'équipe.

Je tiens aussi à remercier Dr. Mélanie Mazurier, Dr. Abed Sbeiti et Dr. Yanis Amokrane pour leur aide et leur sympathie qui a favorisé mon intégration dans l'équipe.

Je n'oublie pas de remercier toutes les personnes qui ont aidé du près ou du loin dans la réalisation ce travail.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ma très chère mère, mon idole, qui a sacrifié ses belles nuits rien que pour me voir réussir, et qu'a été toujours pour moi une source de tendresse et de courage.*

*Mon très cher père qui est ma source d'espoir, du savoir, son courage et sa patience toujours pour moi autant d'exemple.*

*A mon frère et mes sœurs pour leur soutien et leur encouragement tout au long ma vie.*

*A mes meilleures et plus chères amies Amina Ayadi, Imen Haddoudi, Marwa Batnini et Takwa Marzouk qui ont rendu le travail aux laboratoires plus aisé et plus légers, leur aide aussi ne manquer pas de présence et leur soutien moral n'a cessé pas dans et hors les heures de travail.*

*A mon cher Patis, qui m'a soutenu depuis notre connaissance et qui m'a poussé à travailler de plus pour améliorer mes qualités personnelles et ma carrière professionnelle*

*A mon amie Basma Midouni pour son encouragement continu et son soutien moral durant les moments les plus critiques*

*A ma chère Jihed Aouini, pour son soutien morale et aide précieux*

*A Bilel Khiari et Amani Ben Alaya, mes amis d'équipe « projet3 » pour leur aide, patience et leur soutien durant ces années de thèse.*

*A Selim Ghrir pour son soutien et son pouvoir à rendre mes moments de faiblesse en des moments de sourires continus avec son sens de bonne humeur.*

*A mes amis spéciaux Souad Insaf Djouider, Elana Dayoub, Housseem Talbi et Fabrizio Mastrorocco pour leur encouragement continu, leur soutien moral et leur empreinte marquante dans ma vie.*

*Au service hospitalier de Pr. Tritar à l'hôpital Abed Rahmen Mami : Dr. Ben Mansour, les médecins residents Dr. Wajih et Dr. Nader qui ont sauvé ma vie. Je tiens à leur exprimer un respect immense quant à leur métier noble, leur professionnalisme et leur travail permanent pour soutenir leurs patients*

## Résumé

Depuis un demi-siècle, les agriculteurs utilisent les pesticides chimiques pour lutter contre agents phytopathogènes. Cette utilisation systématique a conduit à plusieurs effets négatifs sur la santé humaine et l'environnement. Par conséquent, les systèmes de cultures modernes s'orientent vers des solutions innovantes écologiquement compatibles. Dans ce contexte, cette étude vise à étudier l'effet bioprotecteur des bactéries endophytes bénéfiques et de leurs substances bioactives pour la lutte contre les agents phytopathogènes chez une espèce végétale cultivée, la tomate (*Solanum lycopersicum*) et une espèce sauvage, la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*). Une première partie de ce travail a été consacrée à l'étude des activités antifongiques et de bioprotection des composés organiques volatils (COV) produits par des bactéries endophytes isolées à partir de la tomate pour prévenir l'infection par *Botrytis cinerea* en post-récolte. Cinquante souches bactériennes ont été isolées de différents sites de la région du CapBon en Tunisie de différents organes. Au total, 36 % des souches bactériennes endophytes produisent des COV avec un effet antifongique contre *B. cinerea in vitro*. Parmi celles-ci, cinq souches ont été sélectionnées pour une étude approfondie (4 souche de Bacillus et 1 souche d'Enterobacter). Il a été montré qu'elles produisent un noyau commun de sept COV ainsi que différents COV antifongiques spécifiques et connus. Le test de bioprotection des fruits de tomate a montré que la souche *Enterobacter* TR1 produit les COV les plus protecteurs contre l'infection par *B. cinerea* avec le 3-méthylbutan-1-ol en tant que composé volatil majeur qui a été à son tour tester et a prouvé son efficacité in vitro comme in vivo sur les fruits de tomate. Dans la seconde partie nous avons étudié l'effet antagoniste et bioprotecteur des consortia bactériens endophytes issus de la légumineuse sauvage *Medicago truncatula* contre les agents pathogènes racinaires *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae*. Une collection de 976 souches bactériennes a été établit sur la base d'un isolement fait de deux site salins (Solima et Ennfidha) et deux sites non salins (Bulla-Regia et ElKef) du Nord de la Tunisie. Les résultats ont montré que les plantes de *M. truncatula* saines hébergent une diversité bactérienne endophyte remarquable qui diffère entre les sites de collecte salins et non salins. Les tests d'antagonisme *in vitro* ont montré que >90% des consortia bactériens ont une activité contre *P. medicaginis* et *V. alfalfae*, respectivement. Le consortium antagoniste le plus actif composé de 4 souches appartenant au genre Bacillus a montré un effet protecteur des plants de *M. truncatula* contre l'attaque par *P. medicaginis* et *V. alfalfae in vivo*. L'étude de l'expression de quelques gènes impliqués dans le système de défense (LOX, PAL, PR4, PR5, PR10) chez les plantes a montré que les voies de signalisation de l'acide jasmonique/éthylène et de l'acide salicylique sont impliquées dans l'induction de la résistance systémique chez les plantes de *M. truncatula* amorcée par le consortium bactérien sélectionné contre l'attaque de *P. medicaginis*.

**Mots clés :** Activité antifongique, consortia endophytes, maladie de la tige noire, pourriture grise, résistance systémique induite, verticilliose, tomate (*Solanum Lycopersicum*), *Medicago truncatula*

## Abstract

For half a century, farmers have used chemical pesticides to control plant pathogens. This systematic use has led to several negative effects on human health and the environment. Therefore, modern cropping systems are moving towards innovative ecologically compatible solutions. In this context, this study aims to study the bioprotective effect of beneficial endophytic bacteria and their bioactive substances for the fight against phytopathogenic agents in a cultivated plant species, tomato (*Solanum lycopersicum*) and a wild species, truncated alfalfa (*Medicago truncatula*). A first part of this work was devoted to the study of antifungal activities and the bioprotection of volatile organic compounds (VOCs) produced by endophytic bacteria isolated from tomato to prevent postharvest infection by *Botrytis cinerea*. Fifty bacterial strains were isolated from different sites in the CapBon region in Tunisia from different organs. In total, 36% of endophytic bacterial strains produce VOCs with an antifungal effect against *B. cinerea* in vitro. Of these, five strains were merited for further study (4 *Bacillus* strain and 1 *Enterobacter* strain). They have been shown to produce a common core of seven VOCs as well as various specific and known antifungal VOCs. The tomato fruit bioprotection test showed that the *Enterobacter* TR1 strain produced the most protective VOCs against *B. cinerea* infection with 3-methylbutan-1-ol as the major volatile compound which in turn was tested and has proven its effectiveness in vitro antifungal experiment and in vivo on tomato fruits. In the second part we studied the antagonistic and bioprotective effect of endophytic bacterial consortia from the wild legume *Medicago truncatula* against the root pathogens *Phoma medicaginis* and *Verticillium alfalfae*. A collection of 976 bacterial strains was established on the basis of an isolation made from two saline sites (Solima and Ennfidha) and two non-saline sites (Bulla-Regia and ElKef) in northern Tunisia. The results showed that healthy *M. truncatula* plants harbor a remarkable endophytic bacterial diversity that differs between saline and non-saline collection sites. In vitro antagonism tests have shown that > 90% of bacterial consortia have activity against *P. medicaginis* and *V. alfalfae*, respectively. The most active antagonist consortium composed of 4 strains belonging to the genus *Bacillus* showed a protective effect of *M. truncatula* plants against attack by *P. medicaginis* and *V. alfalfae* in vivo. The study of the expression of some genes useful in the defense system (LOX, PAL, PR4, PR5, PR10) are involved in the induction of systemic resistance in plants of *M. truncatula* initiated by the selected bacterial consortium against attack by *P. medicaginis*.

**Key words:** Antifungal activity, endophytic consortia, black stem disease, gray mold, induced systemic resistance, verticillium wilt.

## Liste des Publications

### Article paru dans une revue à comité de lecture

**Chaouachi, M.**, Marzouk, T., Jallouli, S., Elkahoui, S., Gentzbittel, L., Ben, C., & Djébali, N. Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 172(2021), 111389.

### Article accepté avec révisions

Marzouk,T., **Chaouachi,M.**, Sharma,A., Jallouli,S., Kaushik,N. & Djebali,N., 2021. Volatile organic compounds of Tomato seed-borne endophytes plant growth promotion and biocontrol activities. (under review "Postharvest Biology and Technology)

### Articles en préparation

**Chaouachi, M.**, Abid, G., Khiari, B., Marzouk, T., Badri, M., Gentzbittel, L., Ben, C. & Djebali, N. 2021. *Medicago truncatula* bacterial endophytes: Biodiversity and disease suppression activities

**Chaouachi, M.**, Khiari, B., Chennaoui, S., Badri, M. & Djébali, N. 2021. *Medicago truncatula* response to combined biotic and abiotic stresses

Marzouk, T., Kaushik, N., Sharma, A., **Chaouachi, M.** & Djebali.N, 2021. Endophytic microbes as abiotic stress controller in plants (review).

## Sommaire

<b>Introduction générale et Problématique.....</b>	<b>11</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Importance des endophytes .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Notion du microbiome, pyramide de la maladie et du pathobiome .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2. Importance des endophytes chez les plantes.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3. Colonisation des plantes par les bactéries endophytes.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.1. Transmission verticale des endophytes.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.1. Transmission horizontale.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.1. Processus de colonisation des plantes par les bactéries endophytes.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.3.1. Colonisation de la rhizosphère par les bactéries endophytes.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.1.1. Colonisation des racines par les bactéries endophytes.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.1.1. Colonisation des parties aériennes par les bactéries endophytes.....</b>	<b>30</b>
<b>1.4. Classification et diversité des bactéries endophytes.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4.1. Facteurs affectant la diversité des bactéries endophytes dans les plantes..</b>	<b>31</b>
<b>1.4.2. Diversité des bactéries endophytes dans les plantes.....</b>	<b>32</b>
<b>1.4.3. Diversité des endophytes chez la solanacéemodèle <i>Solanum lycopersicum</i> L...</b>	<b>34</b>
<b>1.4.3.1. Importance de la tomate.....</b>	<b>34</b>
<b>1.4.3.2. Diversité phylogénétique des endophytes bactériens de la tomate.....</b>	<b>35</b>
<b>1.4.4. Diversité des endophytes chez la plante modèle <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>1.4.4.1. Importance des légumineuses .....</b>	<b>36</b>
<b>1.4.4.2. Diversité phylogénétique des endophytes bactériens des légumineuses.</b>	<b>37</b>
<b>2. Effet des bactéries endophytes sur les plantes .....</b>	<b>38</b>
<b>2. 1. Besoin de nouvelles stratégies pour l'amélioration de la production des plantes .....</b>	<b>38</b>
<b>2. 2. Mécanismes de promotion de la croissance de plantes par les bactéries endophytes.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2.1. Phytostimulation.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2.2. Production d'hormones .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2.2.1. Modulation duniveau de l'acide indole acétique.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2.2.2. Production des cytokinines et gibbérellines.....</b>	<b>43</b>

2.2.2.3.	Modulation du niveau d'éthylène et production d'ACC-déaminase.....	44
2.2.3.	Biofertilisation.....	45
2.2.3.1.	Fixation de l'azote.....	45
2.2.3.2.	Assimilation du phosphore.....	46
2.2.3.3.	Séquestration du fer.....	46
2.3.	Mode indirect d'action des bactéries endophytes sur les plantes hôtes : protection contre les maladies .....	47
2.3.1.	Protection des plantes par les composés antimicrobiens produits par les bactéries endophytes.....	47
2.3.1.1.	Les composés antimicrobiens solubles (Production des enzymes lytiques et des antibiotiques).....	47
2.3.1.2.	Protection des plantes par les composés organiques volatils produits par les bactéries endophytes.....	49
2.3.1.3.	Protection des plantes par l'induction de la résistance systémique chez les plantes.....	49
3.	Utilisation des bactéries endophytes pour la lutte biologique contre quelques agents pathogènes de la tomate et de la luzerne annuelle.....	53
3.1.	Lutte biologique contre la pourriture grise chez la tomate.....	53
3.1.1.	Impact économique, taxonomie, symptômes, spectre d'hôtes et cycle de vie de <i>Botrytis cinerea</i> .....	53
3.1.2.	Biocontrôle de <i>Botrytis cinerea</i> .....	56
3.2.	Lutte biologique contre la maladie de la tige noire chez la luzerne.....	57
3.2.1.	Taxonomie, cycle de vie et de dispersion du <i>Phoma medicaginis</i> .....	57
3.2.2.	Interaction <i>Medicago truncatula</i> – <i>Phoma medicaginis</i> .....	59
3.2.3.	Biocontrôle de <i>Phoma medicaginis</i> .....	60
3.3.	Lutte biologique contre la verticilliose chez la luzerne.....	60
3.3.1.	Taxonomie, spectre d'hôte, cycle de vie et mode de dispersion de <i>Verticillium alfalfae</i> .....	60
3.3.2.	Interaction <i>Medicago truncatula</i> – <i>Verticillium alfalfa</i> .....	63
3.3.3.	Biocontrôle de <i>Verticillium</i> .....	64
4.	Objectifs de l'étude.....	66
	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>67</b>
1.	Matériel biologique.....	68
1.1.	Souches bactériennes.....	68
1.1.1.	Isolement des souches bactériennes endophytes de <i>Solanum lycopersicum L</i>	68

1.1.2. Isolement des souches bactériennes endophytes de <i>Medicago truncatula</i> ...	69
1.1.2. Souches bactériennes témoins .....	70
1.2. Souches fongiques.....	70
1.3. Matériel végétal.....	70
2. Test d'activité antifongique des bactéries endophytes.....	71
2.1. Test d'activité antifongique des souches bactériennes de tomate contre <i>Botrytis cinerea</i> .....	71
2.1.1. Test d'activité antifongique des composés organiques volatils bactériens contre <i>Botrytis cinerea</i> .....	71
2.1.2. Test d'activité antifongique des composés solubles des souches bactériennes endophytes de tomate contre <i>B. cinerea</i> .....	72
2.1.3. Test d'activité antifongique des composées volatiles pures .....	72
2.2. Test d'activité antifongique des consortia bactériens de <i>M. truncatula</i> contre <i>P. medicaginis</i> et <i>V. alfalfae</i> .....	72
2.2.1. Test d'activité antifongique des cellules végétatives des consortia bactériens	72
2.2.2. Test d'activité antifongique des filtrats des consortia bactériens.....	73
3. Test d'activité <i>invitro</i> des COVs des bactéries endophytes sur la croissance des plantules de tomate.....	74
4. Essais de bio-protection <i>invivo</i> .....	75
4.1. Test de bio-protection des fruits de tomate par les COVs bactériens contre <i>Botrytis cinerea</i> .....	75
4.2. Test de bio-protection des fruits de tomate par des cellules végétatives bactériennes contre <i>Botrytis cinerea</i> .....	76
4.3. Test de bio-protection des fruits de tomate par le composé volatil pur .....	76
4.4. Test de bio-protection <i>invivo</i> des plantules de <i>Medicago truncatula</i> .....	77
4.4.1. Germination des graines et inoculation par les bactéries.....	77
4.4.2. Test de bio-protection des plantes de <i>M. truncatula</i> contre <i>P. medicaginis</i> ...	77
4.4.3. Test de bio-protection des plantules de <i>M. truncatula</i> contre <i>V. alfalfae</i> ...	78
5. Caractérisation moléculaire des souches bactériennes.....	79
5.1. Extraction de l'ADN génomique bactérien.....	79
5.2. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	79
5.3. Purification des produits PCR.....	81
5.4. Séquençage de l'ADN.....	82
5.5. Assemblage, alignement et construction de l'arbre phylogénétique des souches bactériennes.....	83
6. Caractérisation moléculaire des souches de <i>Botrytis cinerea</i> .....	83

6.1.	Extraction de l'ADN fongique et PCR.....	83
6.2.	Purification des bandes à partir du gel et séquençage de l'ADN.....	85
6.3.	Assemblage, alignement et construction de l'arbre phylogénétique des souches fongiques.....	86
7.	Caractérisation biochimique des souches bactériennes endophytes de tomate	86
8.	Analyse des substances volatiles par SPME-Chromatographie en phase gazeuse - Spectromètre de masse (SPME-GC-MS).....	87
9.	Etude de l'expression de quelques gènes de défense chez les plantes de <i>Medicago truncatula</i> immunisées par le consortium et soumises à l'attaque par <i>Phoma medicaginis</i> .....	88
9.1.	Matériel biologique.....	88
9.2.	Extraction de l'ARN.....	88
9.3.	La qRT-PCR pour l'étude de l'expression des gènes.....	89
9.3.1.	Traitement à la DNase.....	89
9.3.2.	Synthèse de l'ADNc.....	89
9.3.2.	PCR semi-quantitative .....	90
5.1.1.	PCR quantitative.....	90
10.	Analyse statistique.....	91
10.1.	Calcul de paramètres de maladie permettant la prise en compte de la cinétique d'évolution de symptômes .....	91
10.2.	Plans expérimentaux mis en place et modèles d'analyse statistique associés ...	91
10.2.1.	Plan en blocs augmentés .....	91
10.2.2.	Plan en parcelles divisées.....	91
10.3.	Analyse de variance .....	92
	Analyse des Résultats de recherche.....	93
	<b>Chapitre 1 : Etude du pouvoir antifongique et bio-protecteur des bactéries endophytes de <i>Solanum lycopersicum L.</i> contre l'agent de la pourriture grise (<i>Botrytis cinerea</i>) en condition de post-récolte .....</b>	<b>94</b>
1.	Caractérisation de la collection de bactéries endophytes de <i>S.lycopersicum L...</i>	95
2.	Activité antifongique des composés organiques volatils bactériens.....	97
3.	Effet des composés organiques volatils bactériens sur la germination des graines de tomates et la croissance des plantules.....	103
4.	Corrélation entre les activités antifongiques et de croissance des plantes des composés organiques volatils bactériens et regroupement des souches.....	108
5.	Caractérisation des souches des bactéries endophytes sélectionnées pour lutter contre <i>Botrytis cinerea</i> .....	111

5.1.	Sélection des souches des bactéries endophytes.....	111
5.1.	Identification des composés organiques volatils produits par les souches des bactéries endophytes sélectionnées.....	111
5.3.	Caractérisation de l'activité des composés solubles sécrétés par les bactéries endophytes sélectionnées.....	114
6.	Contrôle biologique de <i>B. cinerea</i> sur les fruits de tomate par les COVs et les cellules végétatives des bactéries endophytes.....	119
7.	Activité antifongique du composé volatil majeure le 3-méthylbutan-1-ol	125
7.1.	Activité antifongique sur les colonies fongiques <i>in vitro</i> .....	125
7.2.	Test de bioprotection par 3-méthylbutan-1-ol contre l'infection par <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de tomate .....	127
Chapitre 2 : Evaluation de l'activité antifongique et de bio-protection des consortia bactériens endophytes de <i>Medicago truncatula</i> contre <i>Phoma medicaginis</i> et <i>Verticillium alfalfae</i> .....		131
1.	Caractérisation de la collection de bactéries endophytes de <i>M.truncatula</i> .....	132
2.	Activité antifongique des consortia bactériens contre <i>Phoma medicaginis</i> et <i>Verticillium alfalfae</i> .....	134
2.1.	Activité antifongique des cellules végétatives des consortia bactériens contre <i>P.medicaginis</i> et <i>V.alfalfae</i> .....	134
2.2.	Activité antifongique des filtrats des consortia bactériens contre <i>P.medicaginis</i> et <i>V.alfalfae</i> .....	138
3.	Etude phylogénétique du consortium bactérien sélectionné .....	140
4.	Bio-protection des plantes de <i>Medicago truncatula</i> contre l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> .....	142
4.1.	Etude des paramètres de croissance et d'infection .....	142
5.2.	Analyse de l'expression relative des gènes cibles par q-RT-PCR chez les plantes de la lignée A17 de <i>M.truncatula</i> .....	154
5.	Essai de contrôle biologique <i>in vivo</i> de <i>Verticillium alfalfae</i> sur des plantes de <i>Medicago truncatula</i> par le consortium bactérien endophyte.....	163
<b>Discussion</b> .....		171
<b>Conclusion et Perspectives</b> .....		181
<b>Bibliographie</b> .....		187
<b>Annexes</b> .....		229

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Triangle de la maladie .....	<b>17</b>
<b>Figure 2.</b> Adaptation de la représentation de la pyramide de la maladie .....	<b>19</b>
<b>Figure 3.</b> Un diagramme schématique du système complexe de l'holobionte végétal, y compris les microbes bénéfiques associés aux plantes « le symbiome » et les microbes pathogènes collectifs « le pathobiome » .....	<b>21</b>
<b>Figure 4.</b> Les voies de pénétration des bactéries endophytes dans les différents organes de la plante. ....	<b>24</b>
<b>Figure 5.</b> Résumé schématique des voies de colonisation et des déterminants, des modes de transmission et des fonctions des bactéries endophytes des semences. ....	<b>25</b>
<b>Figure 6.</b> Les sites de colonisation des plantes par les bactéries endophytes .....	<b>30</b>
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique des modèles de colonisation bactérienne dans une feuille.....	<b>31</b>
<b>Figure 8.</b> Représentation schématique de la production annuelle des tomates dans le monde .....	<b>35</b>
<b>Figure 9.</b> Représentation schématique globale de l'intensification agricole écologique (IAE) par les endophytes et leurs mécanismes d'action.....	<b>40</b>
<b>Figure 10.</b> Diagramme schématique montrant deux types différents de résistance systémique chez les plantes.....	<b>51</b>
<b>Figure 11.</b> Cycle de vie de <i>Botrytis cinerea</i> et symptômes associés .....	<b>55</b>
<b>Figure 12.</b> Cycle de vie de <i>Phoma</i> sur les plantes hôtes .....	<b>58</b>
<b>Figure 13.</b> Symptômes de la maladie de la tige noire causée par <i>P.medicaginis</i> sur les luzernes .....	<b>59</b>
<b>Figure 14.</b> Cycle de vie de <i>Verticillium</i> chez les plantes hôtes .....	<b>62</b>
<b>Figure 15.</b> Symptômes de la verticilliose .....	<b>63</b>
<b>Figure 16.</b> Etapes de l'isolement des bactéries endophytes.....	<b>68</b>
<b>Figure 17.</b> Système de culture du test d'activité antifongique des COVs des bactéries endophytes par la méthode de doubles boites .....	<b>71</b>
<b>Figure 18.</b> Système de culture pour tester l'activité antifongique des cellules végétatives des consortia bactériens contre les agents phytopathogènes.....	<b>73</b>
<b>Figure 19.</b> Système de culture pour tester l'activité antifongique des substances solubles des consortia bactériens contre les agents phytopathogènes.....	<b>74</b>
<b>Figure 20.</b> Système de culture pour tester l'effet des composés organiques volatils bactériens sur la germination des graines de tomates.....	<b>75</b>
<b>Figure 21.</b> Système expérimental pour tester l'effet bio-protecteur des COVs bactériens sur les fruits de la tomate contre l'infection par <i>B.cinerea</i> .....	<b>76</b>
<b>Figure 22.</b> Système de culture <i>in vitro</i> des plantules de <i>Medicago truncatula</i> .....	<b>78</b>
<b>Figure 23.</b> Représentation schématique de la structure de l'ARN ribosomique chez les champignons et de l'emplacement des amorces ITS4 et ITS6 pour l'amplification des régions ITS. ....	<b>84</b>
<b>Figure 24.</b> Collection de souches bactériennes endophytes isolées de différents organes de plantes de tomates saines.....	<b>96</b>
<b>Figure 25.</b> Évaluation de l'activité antifongique <i>invitro</i> des composés organiques volatils (COV) des bactéries endophytes.....	<b>99</b>
<b>Figure 26.</b> Arbre phylogénétique (Neighbor joining) de 18 souches de bactéries endophytes isolées de tomate.....	<b>103</b>

<b>Figure 27.</b> Évaluation de l'effet <i>in vitro</i> des composés organiques volatils bactériens (COV) sur la germination des graines et la croissance des plantules de tomates après 6 jours de culture.	<b>106</b>
<b>Figure 28.</b> Corrélations entre les paramètres relatifs à l'activité antifongique et à effet sur la croissance des plantules des COVs des bactéries endophytes.	<b>109</b>
<b>Figure 29.</b> Regroupement des bactéries endophytes (Heatmap) en fonction de l'activité antifongique et de l'effet sur la croissance des plantules de leurs COVs.	<b>110</b>
<b>Figure 30.</b> Regroupement des cinq souches de bactéries endophytes (BF11, DHT2, H1F1, H2F12 et TR1) en fonction de leurs profils de production des composés volatils détectés par la technique SPME-GC / MS.	<b>113</b>
<b>Figure 31.</b> Diagramme de Venn montrant le nombre des COVs communs produits par 5 souches bactériennes endophytes. L'analyse a été faite sur la base des pourcentages de détection des COV à 7 et 14 jours. Le Diagramme de Venn a été généré par la fonction vennDiagram du package limma du logiciel R.	<b>114</b>
<b>Figure 32.</b> Activité antifongique <i>invitro</i> des composés solubles produits par cinq souches de bactéries (BF11, DHT2, H1F1, H2F12 et TR1) contre les souches S2 et S5 de <i>B. cinerea</i> .	<b>115</b>
<b>Figure 33.</b> Illustration de la capacité des bactéries endophytes à produire des enzymes hydrolytiques et de sidérophores.	<b>117</b>
<b>Figure 34.</b> Effet des composés organiques volatils (COV) de cinq souches de bactéries endophytes sur l'infection à <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de tomate.	<b>120</b>
<b>Figure 35.</b> Effet du traitement avec des cellules végétatives de cinq souches de bactéries endophytes sur l'infection par les souches S2 et S5 de <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de tomate.	<b>123</b>
<b>Figure 36.</b> Activité antifongique <i>invitro</i> du composé volatil 3-méthylbutan-1-ol contre les souches S2 et S5 de <i>Botrytis cinerea</i> . L'activité antifongique a été évaluée par la diminution de la croissance des colonies fongiques par rapport au témoin «sans 3-méthylbutan-1-ol» sur milieu PDA après 5 jours de co-confrontation.	<b>125</b>
<b>Figure 37.</b> Effet du 3-méthylbutan-1-ol sur l'infection à <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de tomate.	<b>128</b>
<b>Figure 38.</b> Collection de souches bactériennes endophytes isolées à partir de deux organes de plantes de <i>M. truncatula</i> collectées dans les sites du Nord de la Tunisie	<b>133</b>
<b>Figure 39.</b> Illustration de la diversité morphologique des souches bactériennes issues des sites de collecte des échantillons de plantes de <i>Medicago truncatula</i> (Soliman, Enfidha, Bulla-Regia et ElKef).	<b>134</b>
<b>Figure 40.</b> Activité antifongique <i>invitro</i> des consortia bactériens endophytes contre <i>Phoma medicaginis</i> et <i>Verticillium alfalfae</i> sur la base de l'aire sous courbe de progression de la croissance (AUGPC) des souches fongiques.	<b>137</b>
<b>Figure 41.</b> Activité antifongique <i>invitro</i> des filtrats des consortia bactériens endophytes contre <i>Phoma medicaginis</i> et <i>Verticillium alfalfae</i> sur la base de l'aire sous courbe de progression de la croissance (AUGPC) des souches fongiques.	<b>139</b>
Arbre phylogénétique (Neighborjoining) de 4 souches de bactéries endophytes du consortium BF25	<b>141</b>
<b>Figure 43.</b> Corrélations entre les paramètres de croissance et d'infection mesurés sur des plantes de <i>Medicago truncatula</i> prétraitées avec le consortium bactérien endophyte et infectées ou pas par <i>Phoma medicaginis</i> .	<b>144</b>
<b>Figure 44.</b> Regroupement des traitements (Heatmap) en fonction des paramètres de croissance et de protection des lignées de <i>Medicago truncatula</i> (A17 et F38) prétraitées ou pas par le consortium bactérien BF25 contre l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> .	<b>145</b>
<b>Figure 45.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> (Pm8) sur l'aire sous la courbe d'évolution du nombre des feuilles vertes chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de <i>Medicago truncatula</i> .	<b>147</b>
<b>Figure 46.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> (Pm8) sur l'aire sous la courbe d'évolution de la longueur des racines chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de <i>Medicago truncatula</i> .	<b>148</b>

<b>Figure 47.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> (Pm8) sur l'aire sous la courbe d'évolution du nombre des racines secondaires chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de <i>Medicago truncatula</i> .....	<b>149</b>
<b>Figure 48.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> (Pm8) sur le poids frais des feuilles chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de <i>Medicago truncatula</i> .....	<b>150</b>
<b>Figure 49.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> (Pm8) sur le poids frais des racines chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de <i>Medicago truncatula</i> .....	<b>151</b>
<b>Figure 50.</b> Effet du prétraitement des lignées A17 et F83005.5 de <i>Medicago truncatula</i> par le consortium bactérien BF25 avec ou sans infection par <i>Phoma medicaginis</i> (Pm8) sur l'aire sous la courbe de progression du brunissement des racines. ....	<b>152</b>
<b>Figure 51.</b> Effet du prétraitement des lignées A17 et F83005.5 de <i>Medicago truncatula</i> par le consortium bactérien BF25 avec ou sans infection par <i>Phoma medicaginis</i> (Pm8) sur l'aire sous la courbe de progression du score des pycnides de Pm8 sur les racines.....	<b>153</b>
<b>Figure 52.</b> Regroupement des traitements (Heatmap) en fonction de l'expression des gènes de défense (LOX, PAL, PR4, PR5 et PR10).....	<b>155</b>
<b>Figure 53.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> sur l'expression relative du gène de la LOX (Lipoxygénase) .....	<b>158</b>
<b>Figure 54.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> sur l'expression relative du gène de la PAL.....	<b>159</b>
<b>Figure 55.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> sur l'expression relative du gène de la PR4 .....	<b>160</b>
<b>Figure 56.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> sur l'expression relative du gène de la PR5 .....	<b>161</b>
<b>Figure 57.</b> Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Phoma medicaginis</i> sur l'expression relative du gène de la PR10 .....	<b>162</b>
<b>Figure 58.</b> Corrélations entre le paramètre de croissance et les paramètres d'infection mesurés sur des plantes de <i>Medicago truncatula</i> prétraitées par du consortium bactérien endophyte et infectées ou pas par <i>Verticillium alfalfae</i> . ....	<b>166</b>
<b>Figure 59.</b> Regroupement des traitements (Heatmap) en fonction du paramètre de croissance (PFF) et d'infection (AUDPC et MSS) des lignées (A17 et F38) de <i>Medicago truncatula</i> prétraitées ou non par le consortium bactérien BF25 et infectées ou pas par <i>Verticillium alfalfae</i> (V31.2).....	<b>167</b>
<b>Figure 60.</b> Effet de prétraitement des plantes de <i>Medicago truncatula</i> (A17 et F83005.5) par le consortium bactérien BF25 sur l'évolution des symptômes d'infection de <i>Verticillium alfalfae</i> .....	<b>168</b>
<b>Figure 61.</b> Effet de prétraitement des plantes de <i>Medicago truncatula</i> (A17 et F83005.5) par le consortium bactérien BF25 sur l'évolution du score maximal de symptômes de <i>Verticillium alfalfae</i> . ....	<b>169</b>
<b>Figure 62.</b> Effet de prétraitement des plantes de <i>Medicago truncatula</i> (A17 et F83005.5) par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par <i>Verticillium alfalfae</i> sur le poids frais des feuilles.....	<b>170</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Genres des bactéries endophytes communs isolés de plantes cultivées .....	<b>33</b>
<b>Tableau 2.</b> Bactéries endophytes bénéfiques associées à différentes plantes et leurs propriétés favorisant la croissance des plantes .....	<b>41</b>
<b>Tableau 3.</b> Coordonnées GPS des sites d'échantillonnages des plantes de tomates .....	<b>69</b>
<b>Tableau 4.</b> Coordonnées GPS des sites d'échantillonnages des plantes de <i>Medicago truncatula</i> .....	<b>69</b>
<b>Tableau 5.</b> Mélange réactionnel pour la PCR pour l'amplification de la région 16S et du facteur d'élongation Tuf de l'ADN des souches bactériennes.....	<b>80</b>
<b>Tableau 6.</b> Programme de PCR utilisé pour l'amplification de la région 16S d'ADN bactérien et du facteur d'élongation Tuf.....	<b>80</b>
<b>Tableau 7.</b> Mélange réactionnel pour purification des produits PCR .....	<b>81</b>
<b>Tableau 8.</b> Programme de purification des produits PCR.....	<b>81</b>
<b>Tableau 9.</b> Mélange réactionnel pour la réaction de séquençage des produits PCR purifiés .....	<b>82</b>
<b>Tableau 10.</b> Programme de réaction de séquençage des produits PCR purifiés .....	<b>82</b>
<b>Tableau 11.</b> Composition du milieu réactionnel de la PCR.....	<b>84</b>
<b>Tableau 12.</b> Programme PCR utilisé pour l'amplification d'ADN.....	<b>85</b>
<b>Tableau 13.</b> Mélange réactionnel de la première étape de la synthèse de l'ADNc.. .....	<b>89</b>
<b>Tableau 14.</b> Mélange réactionnel de l'étape de la transcriptase inverse.....	<b>90</b>
<b>Tableau 15.</b> Analyse de la variance de type III de la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> sous l'influence de composés organiques volatils produits par les bactéries endophytes.....	<b>98</b>
<b>Tableau 16.</b> Cinétique et persistance de l'activité antifongique des composés organiques volatils (COV) des bactéries endophytes contre les souches S2 et S5 de <i>Botrytis cinerea</i> .....	<b>101</b>
<b>Tableau 17.</b> Analyse de la variance de type III de la croissance des plantules sous l'influence de composés organiques volatils bactériens endophytes.....	<b>115</b>
<b>Tableau 18.</b> Analyse de la variance de type III de la germination des graines de tomate sous l'influence de composés organiques volatils bactériens endophytes.....	<b>115</b>
<b>Tableau 19.</b> Analyse de la variance de type III de la croissance des mycélia de <i>Botrytis cinerea</i> en présence des composés solubles des souches bactériennes endophytes solubles à 7 jours de co-culture.....	<b>116</b>
<b>Tableau 20.</b> Activités enzymatiques et de promotion de la croissance des plantes des souches de bactéries endophytes.....	<b>118</b>
<b>Tableau 21.</b> Analyse de la variance de type III de l'infection à <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de tomate en présence des composés organiques volatils bactériens endophytes à 6 jours après l'infection.....	<b>121</b>

<b>Tableau 22.</b> Analyse de la variance de type III de l'infection à <i>Botrytis cinerea</i> sur des fruits de tomate après traitement avec des cellules végétatives de cinq bactéries endophytes à 6 jours après l'infection.....	<b>124</b>
<b>Tableau 23.</b> Analyse de la variance de type III de la croissance des colonies de <i>Botrytis cinerea</i> en présence du composé volatil 3-méthylbutan-1-ol à 5 jours de confrontation.	<b>126</b>
<b>Tableau 24.</b> Analyse de la variance de type III de l'infection à <i>Botrytis cinerea</i> sur des fruits de tomate en présence du composé volatil le 3-méthylbutan-1-ol près 6 jours d'infection.	<b>130</b>
<b>Tableau 25.</b> Analyse de la variance de type III de l'activité antifongique des cellules végétatives et les surnageants des consortia bactériens de <i>Medicago truncatula</i> contre <i>Phoma medicaginis</i> et <i>Verticillium alfalfae</i> .....	<b>136</b>
<b>Tableau 26.</b> Analyse de la variance de type III de l'AUGPC des paramètres de croissance : Nombre des Feuilles Vertes (NFV), Nombre de Racines Secondaires (NRS), Longueur des Racines(LR), Poids Frais des Feuilles (PFF), Poids Frais des Racines (PFR), de Longueur du Brunissement (BR) et du score de Pycnides (PYC) des plantes <i>Medicago truncatula</i> infectées ou pas par <i>Phoma medicaginis</i> et pré-inoculées ou pas par le consortium bactérien BF25.....	<b>143</b>
<b>Tableau 27.</b> Analyse de la variance de type III de l'expression relative des gènes LOX, Pal, PR4, PR5 et PR10 des plantes <i>Medicago truncatula</i> infectées ou pas par <i>Phoma medicaginis</i> et pré-inoculées par le consortium bactérien.....	<b>157</b>
<b>Tableau 28.</b> Analyse de la variance de type III de l'évolution des symptômes d'infection (AUDPC) du Score Maximal de Symptômes (MSS) et du Poids Frais des Feuilles (PFF) des plantes de <i>Medicago truncatula</i> infectées <i>Verticillium alfalfae</i> prétraitées par le consortium bactérien BF25.....	<b>167</b>

## Liste des abréviations

AMF : champignons mycorhiziens à arbuscules

AUdPC : Aire sous la courbe de progression de maladie (Area under disease progression curve)

AUGPC : Aire sous la courbe de progression de croissance (Area under growth progression curve)

BR : Brunissement des racines

CFU : Unité formant colonie

CMI : Concentration minimale inhibitrice

COV : Composé organique volatil

ET : Ethylène

HR : Humidité relative

IAE : l'Intensification Agricole Ecologique

ISR : Résistance systémique induite

JA : Acide jasmonique

LB : Luria Bertani

LBA : Luria Bertani Agar

LR : Longueur des racines

NFV : Nombre des feuilles vertes

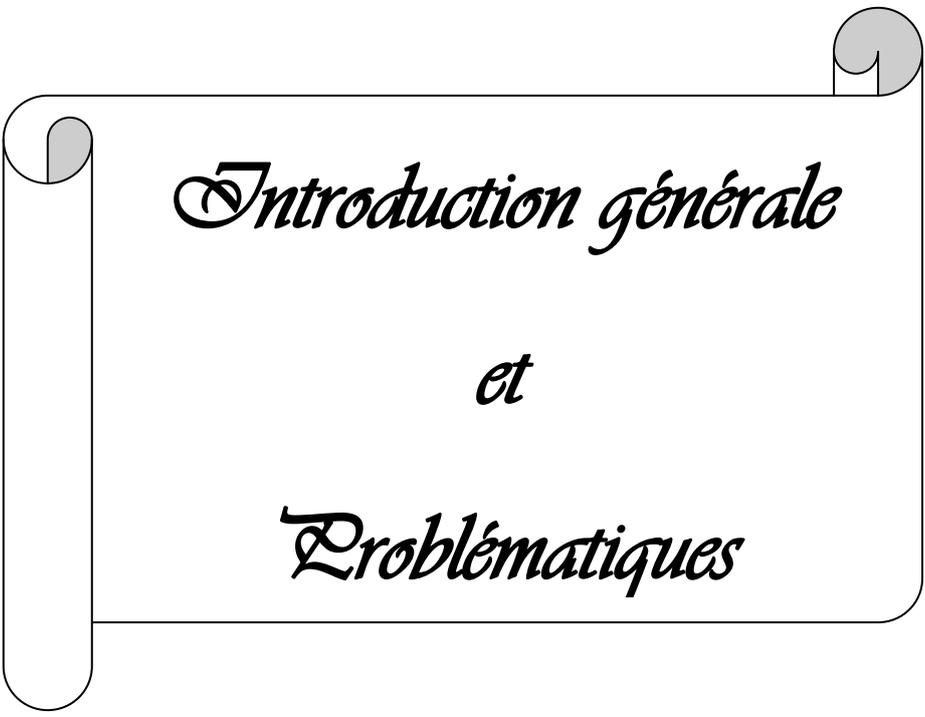
NRS : Nombre des racines secondaires

PDA : Potato dextrose Agar

PFF : Poids frais des feuilles

PFR : Poids frais des racines

SA : Acide salicylique



*Introduction générale*

*et*

*Problématiques*

La population mondiale est en continuel accroissement ce qui fait de l'agriculture une activité primordiale dans le développement économique et mondial puisqu'elle subvient à 80 % de la consommation en aliments dans le monde (FAO, 2014). Pour assurer une production alimentaire régulière, l'agriculture doit faire face aux ennemis des cultures (maladies et ravageurs) qui réduisent environ 20 à 30 % la production agricole dans le monde (Pérez-García et al., 2011). La lutte contre les maladies et ravageurs des cultures a été depuis longtemps dépendante de l'utilisation des pesticides synthétiques qui, malgré leur efficacité, engendrent des conséquences désastreuses sur la santé humaine et l'environnement et ne constituent pas une solution durable vu leurs coûts économiques et environnementaux élevés. En effet, en plus de leur composition en éléments toxiques (métaux lourds), les pesticides chimiques laissent des résidus nocifs dans le sol, l'eau et l'atmosphère, et induisent une pression de sélection des souches résistantes chez les agents phytopathogènes (Arellano-Aguilar et Rendón, 2016 ; Villarreal-Delgado et al., 2018). De ce fait, les législations relatives à l'homologation des pesticides chimiques dans plusieurs pays du monde et en particulier en France et en Tunisie deviennent de plus en plus strictes en vue de la réduction de l'application de fongicides synthétiques en agriculture et même de leur élimination dans les espaces publics. Par conséquent, le développement de nouvelles technologies de lutte contre les ennemis des cultures qui soient efficaces et respectueuses de l'environnement est devenu une nécessité accrue. L'une des alternatives prometteuses pour atteindre cet objectif est la lutte biologique qui repose sur l'utilisation d'organismes naturels et de leurs extraits pour la lutte contre les agents pathogènes des plantes. En effet, cette méthode de lutte est une alternative prometteuse et durable pour réduire à la fois (i) les attaques des maladies et ravageurs des plantes, (ii) le risque de développement la résistance chez les organismes phytopathogènes, ainsi que (iii) la contamination de l'environnement par les éléments toxiques tels que les métaux lourds et en faveur d'une production d'aliments sains et de qualité (Reyes et al., 2015). Historiquement, l'utilisation des agents de lutte biologique a commencé au début du XIXe siècle, mais au cours des dernières décennies les études se sont multipliées pour l'étude de l'effet bioprotecteur des micro-organismes - et en particulier des bactéries - pour la lutte contre les agents phytopathogènes (MEYER, 1962).

Les bactéries ont toujours été privilégiées pour la lutte contre les agents pathogènes en raison de leurs propriétés de colonisation des différentes niches écologiques (épiphytes, endophytes, rhizosphériques) et de production de plusieurs métabolites qui peuvent agir directement sur l'agent pathogène, stimuler les défenses de plantes et/ou améliorer leur

nutrition. Parmi les micro-organismes bactériens, les bactéries endophytes ont suscité l'intérêt des chercheurs du fait de leur capacité à coloniser les tissus internes des plantes sans causer des symptômes de maladies, ainsi que de leurs propriétés de stimuler les défenses et la croissance des plantes (Santoyo et al., 2016). Multiples sont les mécanismes utilisés par les bactéries endophytes pour contrôler les attaques des organismes phytopathogènes des cultures. Des mécanismes d'antagonisme par contact tels que l'hyperparasitisme (Chen et al., 2016) et à distance par la production de composés à faible poids moléculaire tels que les lipopeptides et les enzymes lytiques (chitinases, glucanases, protéases) ont été décrites chez plusieurs endophytes à savoir *Bacillus subtilis*, *B.amyloliquefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces spp.* (Zhang et al., 2016; Jaaffar et al., 2017; Piechulla et al., 2017). Des bactéries endophytes stimulant les mécanismes de résistance induite (ISR pour Induced Systemic Resistance) ont été décrites par plusieurs auteurs (Pal et Gardener, 2006; Chowdhury et al., 2015). Les endophytes bactériens sont aussi connus pour stimuler la croissance des plantes par leur capacité à produire des phytohormones telles que les auxines, les gibbérellines et les cytokinines, ainsi que par leur capacité à solubiliser le phosphore ou de fixation de l'azote atmosphérique (Santoyo et al., 2016).

Mise à part tous ces composés solubles produits par les bactéries endophytes, elles sont aussi connues pour la production d'une panoplie de composés volatils qui peuvent avoir une action directe d'antagonisme contre les agents pathogènes et peuvent aussi stimuler la croissance et les défenses chez les plantes.

Ces métabolites sont communément appelés composés organiques volatils (COV) et peuvent agir directement contre le pathogène (antibiose directe) en détruisant la paroi cellulaire ou indirectement, en induisant une résistance systémique chez la plante (Panpatte et al., 2017). Les COV ont un faible poids moléculaire et sont dérivés des voies de biosynthèse des micro-organismes dans le cadre de leur métabolisme primaire et secondaire (Gotor-Vila et al., 2017). Ils sont utilisés à des fins différentes telles que l'augmentation de la productivité dans l'agriculture ou la protection des plantes contre les maladies fongiques (Panpatte et al., 2017). De nombreux agents bactériens appartenant au genre *Streptomyces* (Li et al., 2012; Wang et al., 2013; Boukaew et al., 2017; Lyu et al., 2020) ou *Pseudomonas* (Vaishnav et al., 2015; Hernández-León et al., 2015 ; Elkahoui et al., 2015; Zhou et al., 2016 ; Raza et al., 2016; Bouaoud et al., 2018) sont capables de produire des COV. On distingue plus particulièrement le genre *Bacillus* qui synthétise des COV ayant une activité antifongique élevée, comprenant des aldéhydes, des cétones, des hydrocarbures, des alcools, etc. (Liu et al.,

2008; Asari et al., 2016; Gotor-Vila et al., 2017 ; Lim et al., 2017 ; Gao et al., 2017 ;Liu et al., 2018; Zhao et al., 2019; Morita et al., 2019 ;Wu et al., 2019; Calvo et al., 2020; Zhang et al., 2020) . Le facteur le plus important qui influence la production de ces métabolites est la souche bactérienne utilisée. Le nombre de COV et leur concentration diffèrent en fonction de l'espèce bactérienne ou encore des souches de la même espèce. De plus, le substrat sur lequel le microorganisme antagoniste est cultivé influence également considérablement la production en raison des différences dans les sources d'azote ou de carbone (Di Francesco et al., 2020; Gotor-Vila et al., 2017; Raza et al., 2016).

La volatilisation aisée de ces composés permettrait leur dispersion à travers tout le verger et les cultivars. Au stade post-récolte, les COV pourraient être considérés comme des antimicrobiens idéaux car leur activité ne nécessite pas de contact entre l'agent de la lutte biologique et le pathogène ou les aliments. Cependant, afin d'accomplir une application fiable, l'étude des modes d'action de l'antagoniste et du pathogène est cruciale pour comprendre leur interaction et leur biologie. La plante ou le fruit comme troisième facteur doit également être pris en compte (Parafati et al., 2015).

Les agents de lutte biologique ont été utilisés pour la lutte contre les agents pathogènes qui attaquent les plantes en cultures et même leurs produits en post-récolte.

Les modes d'action des bactéries endophytes pour lutter contre les agents phytopathogènes des plantes sont dépendants du stade de développement de la plante, soit avant ou après la récolte. En ce qui concerne la période de pré-récolte, des actions prophylactiques, comme l'inoculation des cultures par les agents de lutte biologique pour éliminer les agents pathogènes potentiels qui résident dans le sol agricole, ainsi que pendant la plantation et le développement des plantes jusqu'à l'obtention du fruit, de la graine ou du produit végétal, sont effectuées (Hernández-León et al., 2015). La réduction de l'effet de la maladie en phase pré-récolte est soit le résultat de l'effet indirect des agents de lutte biologique par le biais de la promotion de la croissance de la plante (Mrabet et al., 2011), soit le résultat de l'effet direct des agents de lutte biologique par la production des métabolites comme les lipopeptides (Ben Slimene et al., 2012) ou des enzymes lytiques telle que la chitinase (Slimene et al., 2015), la pectinase et la protéase (Kalai-Grami et al., 2014) ou encore des composés organiques volatiles (Dhouib et al., 2019). Ces métabolites ont été décrits pour leurs effets inhibiteurs contre des phytopathogènes comme *P.medicaginis* et *Verticillium spp.*

Une fois que les fruits ou légumes ont été collectés, ils doivent être transportés et stockés, ce qui continue de les rendre vulnérables aux attaques d'agents pathogènes. Plusieurs des agents pathogènes découverts pendant les périodes de pré-récolte peuvent continuer à affecter la qualité du produit après la récolte comme *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum musae*, *Penicillium expansum* ou *Alternata alternata* (Shafi et al., 2017). Par conséquent, l'application d'agents de lutte biologique sur les cultures après récolte devrait être une priorité pour une production alimentaire durable. La compétition pour l'espace et les nutriments, la production de métabolites diffusibles et de composés organiques volatils constituent les principaux modes d'action utilisés par les endophytes bactériens pour lutter contre les maladies de post-récolte (Zhang et al., 2010 ; Sang and Kim, 2012; Zheng et al., 2013; Gao et al., 2017; Gao et al., 2018; Zhao et al., 2019; Damasceno et al., 2019).

L'objectif de cette thèse est d'étudier la diversité, de sélectionner et d'élucider les mécanismes d'action des bactéries endophytes isolées à partir de deux plantes modèles *Solanum lycopersicum L.* et *Medicago truncatula* pour la lutte contre leurs agents pathogènes à savoir *Botrytis cinerea* d'une part, *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae* d'autre part.

L'étude des bactéries endophytes isolées à partir de la tomate fait l'objet du premier chapitre de cette thèse par l'analyse de leur effet antagoniste et protecteur en condition de post-récolte contre *B.cinerea*.

L'analyse des consortia bactériens endophytes isolés à partir de la luzerne tronquée annuelle fait l'objet du second chapitre avec l'étude de leur effet antagoniste *in vitro* et *in vivo* contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae*.

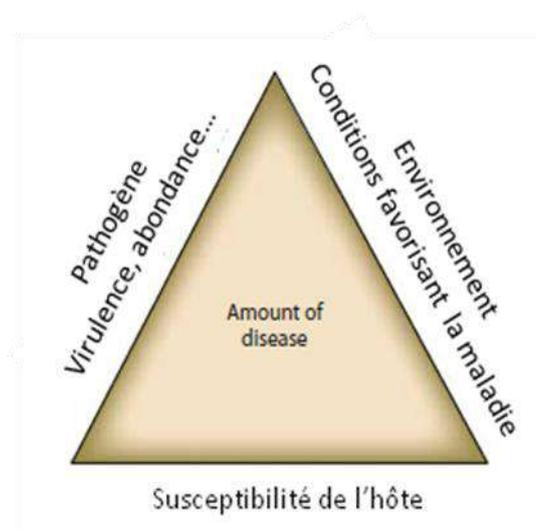


## 1. Importance des endophytes

### 1.1. Notion du microbiome, pyramide de la maladie et du pathobiome

Les maladies des plantes sont considérées comme un facteur majeur affectant le développement de l'agriculture. Traditionnellement, les maladies sont traitées par l'application de pesticides, qui engendrent la pollution de l'environnement et des problèmes de santé pour l'être humain et les animaux.

Selon la théorie du « triangle de la maladie » publiée pour la première fois par Stevens en 1960, l'apparition et la gravité d'une maladie résultent de l'interaction de trois facteurs: la sensibilité de la plante hôte, la virulence du pathogène et les conditions environnementales favorables ou non au développement de la maladie (Figure 1). Pour prévenir la maladie des plantes, il faut modifier au moins l'une de ces trois composantes. Cette relation triangulaire est propre à la phytopathologie par rapport aux sciences vétérinaires et médicales car les plantes terrestres possèdent une faible capacité de stockage thermique et leur immobilité empêche de s'échapper d'un environnement inhospitalier, ce qui met l'accent sur la constitution génétique de l'hôte (Francl, 2001).



**Figure 1.** Triangle de la maladie (Stevens, 1960)

Certains phytopathologistes ont développé la théorie du triangle de la maladie en ajoutant un ou plusieurs paramètres supplémentaires incluant les humains, les vecteurs et le temps. Ce qui a donné lieu à la création de représentations plus complexes tenant en compte de l'ensemble des interactions entre les différents facteurs influant le développement de la maladie chez la plante (Agrios, 2005)

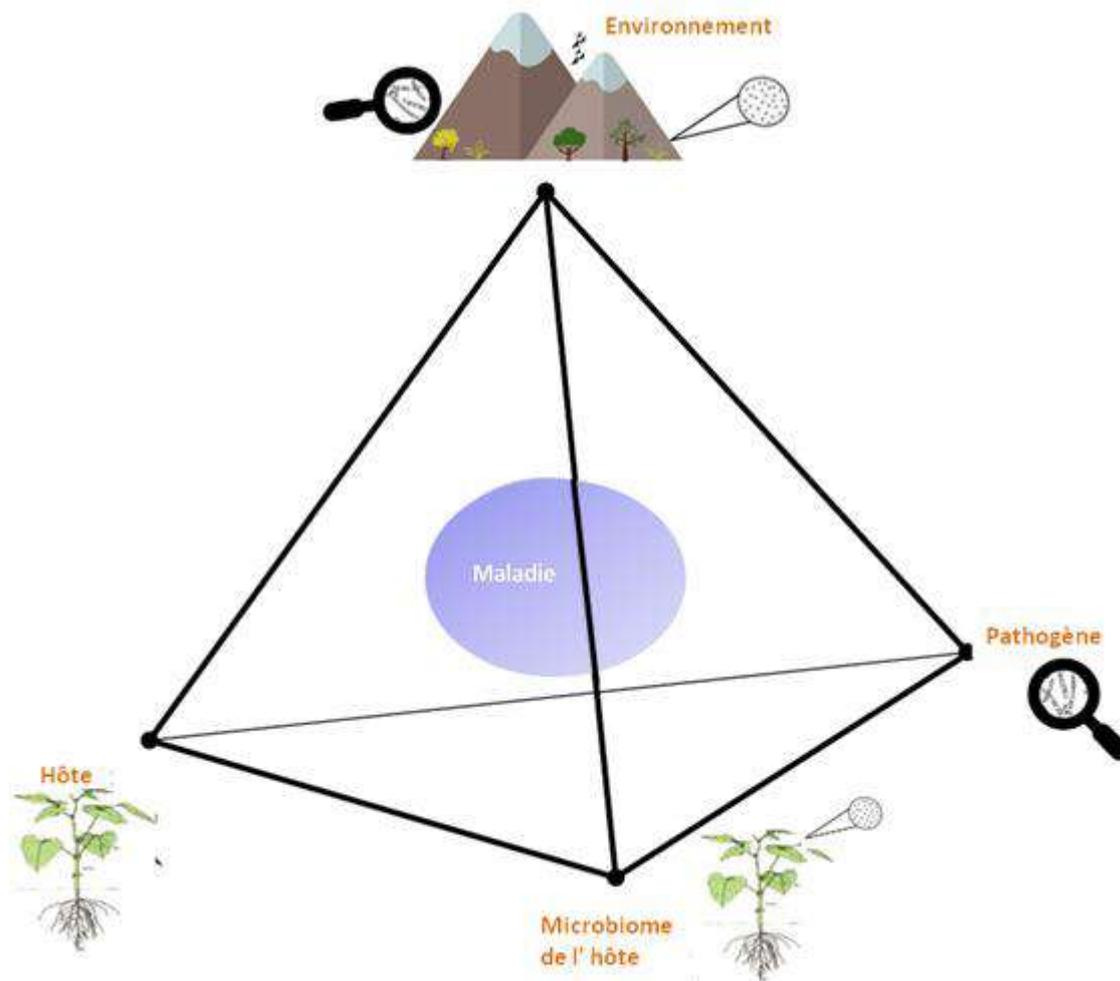
Les communautés microbiennes maintiennent la santé des écosystèmes en influençant le réseau alimentaire mondial, y compris l'agriculture, le cycle des nutriments, l'assimilation de l'azote et la séquestration du CO<sub>2</sub>. De plus, en maintenant la santé des écosystèmes, ils contribuent également à la santé des plantes, de la faune et des humains (Cavicchioli et al., 2019). Des travaux récents révèlent une forte influence du microbiome sur le développement de la maladie et la santé des plantes (Clemente et al., 2012; Cavicchioli et al., 2019).

Dans les dernières années, les chercheurs ont accordé beaucoup d'attention à l'élucidation de la composition et des fonctions des microbiomes des plantes et du sol. Des microbes vivent à l'intérieur (endosphère) ou à l'extérieur (épispère) des tissus végétaux. Parmi ces micro-organismes, les bactéries et les champignons sont prédominants. Environ quelques milliers de taxons bactériens et fongiques ont été signalés dans les tissus végétaux. Ils jouent des rôles importants tels que l'augmentation de la disponibilité des nutriments et de leur absorption par les plantes et l'augmentation de la tolérance des végétaux aux stress. Ainsi, la santé de la plante (croissance et survie) est le résultat du fonctionnement physiologique de la plante en association avec son microbiote (Dastogeer et al., 2020).

Les théories écologiques suggèrent que le microbiome associé aux plantes est façonné par des interactions entre l'hôte, les micro-organismes et l'environnement. Des études basées sur la technique de génétique d'association (ou GWAS, Genome Wide Association Studies) ont montré que le génome de l'hôte influence la composition du microbiome, et de nombreux taxons proviennent du microbiome ancestral, suggérant une rétroaction positive du microbiome végétal durant tous les processus d'évolution. En effet, plusieurs loci de caractères quantitatifs associés à l'adaptation des plantes au stress biotique et abiotique ainsi que des traits morphologiques et physiologiques identifiés chez les végétaux ont été le résultat de la variation dans les traits du microbiome, la richesse en espèces et la structure de la communauté microbienne des racines, de la phyllosphère et de l'endosphère (Trivedi et al., 2020).

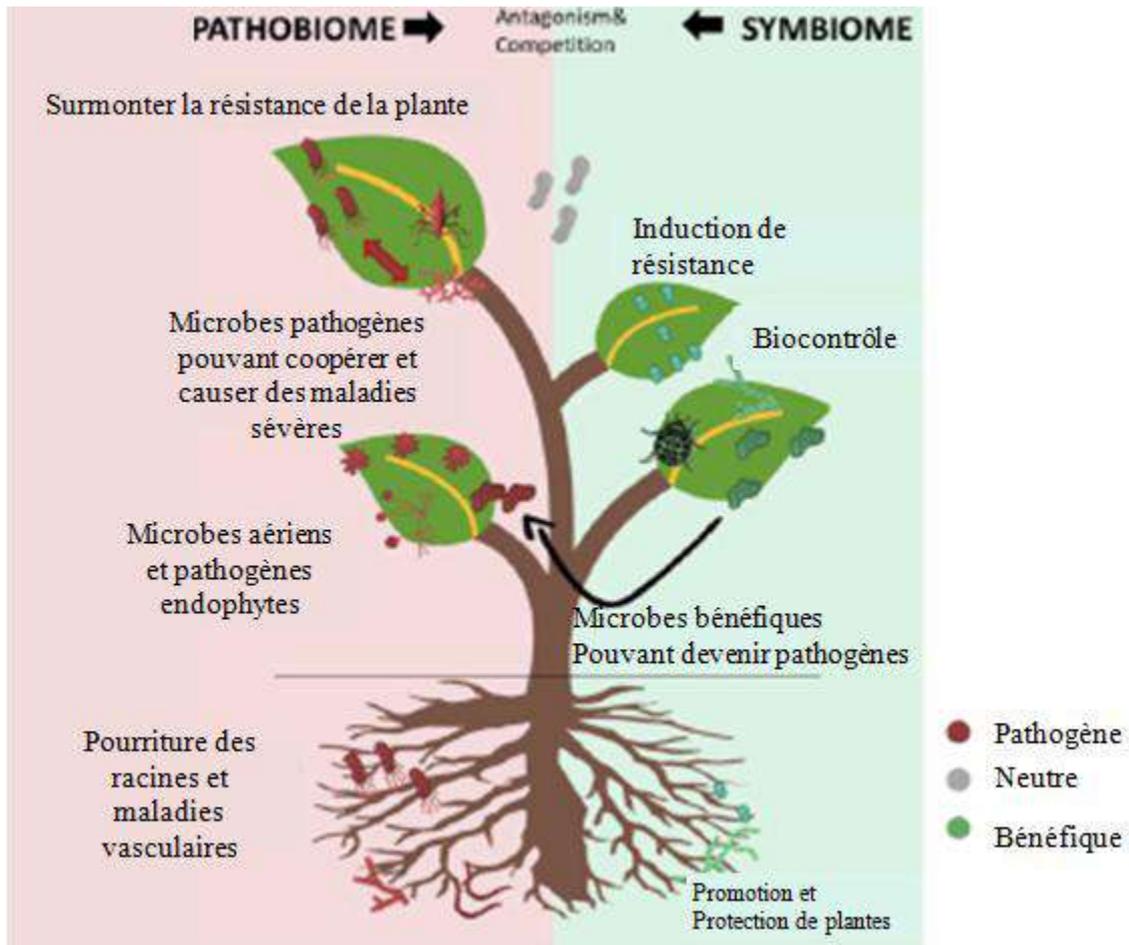
Une étude récente menée par Bernardo-Cravo et al., 2020 a mis en évidence la nécessité de tenir compte de la composante du microbiome de l'hôte dans la dynamique de la maladie. Ces auteurs ont ainsi reformulé le concept de pyramide de la maladie qui contient désormais un gradient de sensibilité de l'hôte, le degré d'antagonisme du microbiome de l'hôte face au pathogène, la pathogénicité du pathogène, et les conditions environnementales (Figure 2). Cette notion nous emmène à déterminer le mode d'interaction entre la plante et son

microbiome, la plante et le stress (abiotique et/ou biotique) et particulièrement entre l'entité plante-microbiome et son environnement (les bioagresseurs et les facteurs abiotiques...).



**Figure 2.** Adaptation de la représentation de la pyramide de la maladie évoquée par Bernardo-Cravo et al., 2020, contenant un gradient de sensibilité de l'hôte (de la résistance et de la tolérance à la sensibilité élevée), le microbiome de l'hôte, la virulence de l'agent pathogène et les conditions environnementales (favorables ou non à l'installation de la maladie). Un microbiome perméable n'agit pas comme un barrière aux agents pathogènes; il permet l'établissement d'agents pathogènes, la prolifération et l'invasion de l'hôte. Un environnement donné interagit simultanément avec l'hôte, le microbiome de l'hôte et le pathogène, en modifiant chacun ainsi que leurs interactions les uns avec les autres. La maladie est plus intense au centre, où la sensibilité, la perméabilité, la pathogénicité sont plus fortes, ainsi que les conditions environnementales les plus favorables à la maladie sont trouvées. Les conditions environnementales comprennent des facteurs biotiques (les microbiomes dans l'environnement) et abiotiques (humidité, température...).

En effet, l'interaction plante-microbiome-pathogène peut nous conduire vers un concept de pathobiome pour mieux expliquer le rôle et la dynamique des communautés microbiennes face à une maladie (Vayssier-Taussat et al., 2014; Bass et al., 2019). Le concept de pathobiome a émergé à l'origine de la recherche sur le microbiome humain, qui s'est avéré essentiel pour maintenir la santé humaine. En conséquence, le terme pathobiome a été inventé pour décrire la communauté microbienne globale liée à la maladie. Le concept de pathobiome a également été utilisé pour représenter les organismes pathogènes complexes affectant les animaux et les plantes (Bass et al., 2019). En général, une plante saine est étroitement associée à une communauté d'organismes stable et diversifiée, représentant les facteurs biotiques qui soutiennent la croissance des plantes et remplissent des fonctions importantes pour l'hôte et qui sont ensemble décrits comme le symbiome. Un déplacement collectif de ce symbiome écologiquement stable vers le pathobiome implique une transition compositionnelle, conduisant à la perturbation de la croissance normale de telle sorte que les plantes ne peuvent pas remplir les fonctions au meilleur de leur potentiel génétique (Pitlik et Koren, 2017). Un pathobiome pourrait être défini comme l'ensemble des organismes (c'est-à-dire des communautés eucaryotes, microbiennes et virales complexes) dans l'environnement biotique de la plante, qui interagissent avec l'hôte pour détériorer son état de santé (Bass et al., 2019 ; Mannaa et Seo, 2021) (Figure 3). Des études récentes sur la pathologie végétale ont démontré que l'hypothèse d'une maladie à un pathogène, basée sur les postulats fondamentaux de Koch, est insuffisante pour décrire le processus de la maladie de manière plus holistique et réaliste, en particulier lorsque des communautés complexes d'organismes sont impliquées (Broberg et al., 2018 ; Mannaa et Seo, 2021). Même lorsqu'un seul agent pathogène est impliqué, d'autres organismes qui l'accompagnent sont susceptibles d'atténuer ou de renforcer les effets pathogènes et devraient donc être considérés comme faisant partie du processus pathologique (Bettenfeld et al., 2020 ; Mannaa et Seo, 2021) (Figure 3).



**Figure 3.** Un diagramme schématisé du système complexe de l'holobionte végétal, y compris les microbes bénéfiques associés aux plantes « le symbiome » et les microbes pathogènes collectifs « le pathobiome ». Les microbes bénéfiques et pathogènes sont en antagonisme continu et en compétition pour l'espace et les nutriments. Lorsque les microbes pathogènes prédominent, ils interfèrent avec les fonctions normales des plantes, entraînant le développement de maladies. Les interactions coopératives entre les microbes pathogènes peuvent entraîner une maladie plus grave et des infections multiples. Le microbiome végétal stable et bénéfique peut être modifié pour faciliter le développement de certaines maladies (Mannaa et Seo, 2021).

Parmi les microbiotes les plus étudiés des plantes dans la dernière décennie sont les endophytes. Une diversité importante en terme de genres et d'espèces des endophytes colonisant les différents organes et tissus des herbacées, des ligneuses ou même des mousses a été démontrée (Hallmann et Berg 2006; Schulz and Boyle, 2014; Mercado-Blanco and Lugtenberg, 2014). Parmi les endophytes les plus étudiés, on distingue les bactéries. Le nombre des cellules bactériennes colonisant les racines peut atteindre  $10^4$  à  $10^8$  cellules par gramme de tissus racinaires (Bulgarelli et al., 2013). Les bactéries endophytes permettent aux

plantes de renforcer leurs capacités à surmonter les différentes contraintes abiotiques et biotiques (Glick, 2015 ;Conrath et al., 2015).

## **1.2. Importance des endophytes chez les plantes**

Des bactéries endophytes ont été trouvées dans toutes les espèces végétales. Ainsi, une plante exempte d'endophytes est une exception rare dans l'environnement naturel (Partida-Martínez and Heil, 2011). Les communautés bactériennes endophytes des racines sont typiquement enrichies en Protéobactéries (50%), Actinobactéries (10%), Firmicutes (10%) et les Bacteroidetes (10%) (Liu et al., 2017). Divers genres tels que *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Paracoccus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus* et d'autres ont été décrits. Les bactéries endophytes affectent la croissance des plantes directement ou indirectement. La promotion directe de la croissance des plantes se produit par la facilitation de l'acquisition de ressources de l'environnement, notamment l'azote, le phosphore et le fer ainsi que la modulation de la croissance des plantes en fournissant ou en régulant diverses hormones végétales, notamment l'auxine, les cytokinines ou l'éthylène. La promotion indirecte de la croissance des plantes se fait par la limitation ou l'empêchement des dommages causés par divers agents pathogènes (les bactéries, les champignons et les nématodes) à travers la production d'antibiotiques ou d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, par l'induction de la résistance systémique chez la plante et la synthèse de composés volatils inhibiteurs des agents pathogènes (Glick, 2015; Conrath et al., 2015).

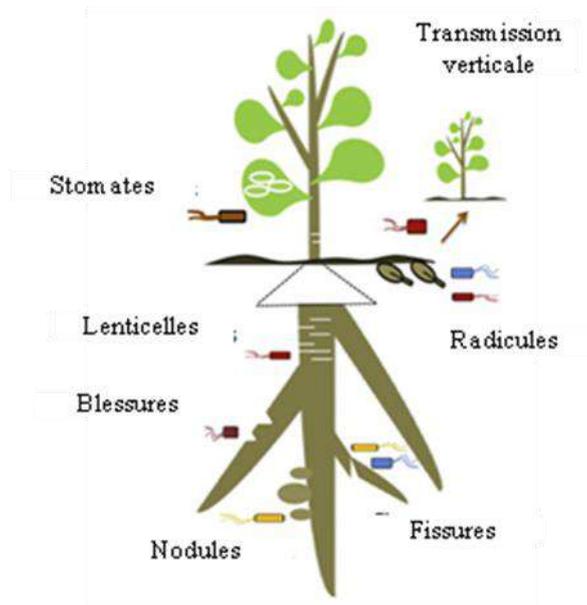
Les communautés bactériennes foliaires sont constituées en grande partie de Protéobactéries, d'Actinobactéries et de Bacteroidetes (Wagner et al., 2016). Dans une étude faite par Horton et al. (2014) afin de caractériser le microbiote des feuilles d'*A. thaliana*, 5 057 Unités Taxonomiques Opérationnelles (ou OTU, d'après l'anglais Operational Taxonomic Units) bactériennes ont été trouvées, la majorité appartenant à des familles dans les Proteobactéries, Bacteroidetes et Actinobactéries. En particulier, *Sphingomonas* ( $\alpha$ -protéobactéries), *Flavobacterium* (Bacteroidetes), *Rhizobium* ( $\alpha$ -protéobactéries) et *Pseudomonas* ( $\gamma$ -protéobactéries). Roman-Reyna et al. (2020) ont montré que la plupart des bactéries endophytes des feuilles de riz appartiennent aux Protéobactéries avec les genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Mycoplasma*, et *Burkholderia* comme les plus abondants. López et al. (2020) ont étudié le bactériome de l'endosphère des plants de tomates malades et sains et ont montré une augmentation substantielle de l'abondance des Actinobactéries dans les communautés à l'intérieur des feuilles de plantes malades par rapport aux plantes saines. Dans les feuilles symptomatiques, les Actinobactéries représentaient 58,28% et s'accompagnaient

d'une diminution des Protéobactéries de 32,86 à 25,72%. En revanche, le bactériome de l'endosphère des feuilles saines présentait 15,73% d'Actinobactéries.

### **1.3. Colonisation des plantes par les bactéries endophytes**

La colonisation des plantes par les microorganismes endophytes se fait par deux voies : une transmission horizontale à partir du milieu environnant (endosphère et phyllosphère) et une transmission verticale par le biais des graines (Santoyo et al., 2016) (Figures 4 et 5).

Les relations écologiques et évolutives ont un impact sur le mode de transmission des endophytes. Dans de nombreuses symbioses transmises verticalement, le symbiote obligatoire passe tout son cycle de vie à l'intérieur de l'hôte et est incapable de survivre dans l'environnement à lui seul (Bright et Bulgheresin 2010). La transmission verticale évolue lorsque les partenaires symbiotiques sont mutualistes, comme un moyen d'assurer une transmission du symbiote bénéfique d'une génération à l'autre (Herre et al., 1999). Il est possible aussi que certains endophytes bactériens soient transmis à la fois verticalement et horizontalement (c'est-à-dire, transmission en mode mixte), tel qu'un endophyte qui est bénéfique à son hôte dans une circonstance particulière (par exemple, la tolérance à un stress biotique) peut être transmis à la progéniture à travers la semence.



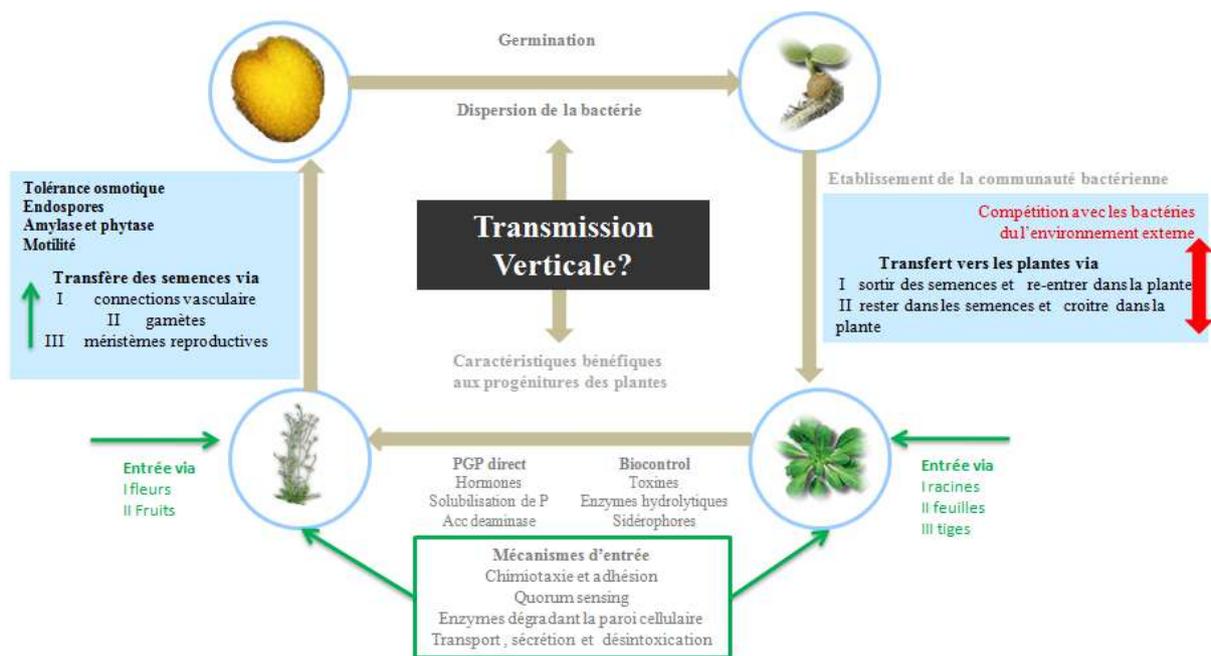
**Figure 4.** Les voies de pénétration des bactéries endophytes dans les différents organes de la plante. La voie la plus courante pour pénétrer est à travers les racines, leurs points d'émergence et les blessures sur les racines. D'autres sites incluent les stomates, sur les feuilles et les jeunes tiges et les lenticelles. En outre, les rhizobiasont capables de coloniser les tissus internes des plantes en formant des nodules. La transmission verticale *via* les semences est également un autre moyen utilisé par les endophytes pour passer d'une génération d'hôte à une autre (Santoyo et al., 2016).

### 1.3.1. Transmission verticale des endophytes

Certaines plantes forment des relations de mutualisme avec des endophytes qui sont transmis *via* les semences (Saikkonen et al., 2010 ; Hodgson et al., 2014). Il existe un certain nombre de genres bactériens que l'on trouve généralement dans les semences, appartenant principalement aux phyla Protéobactéries, Firmicutes, Actinobactéries et Bactéroïdes. Ainsi, des genres tels que *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacteria* et *Microbacterium* ont été trouvés à plusieurs reprises dans des microbiomes de semences d'espèces végétales phylogénétiquement éloignées (Taulé et al., 2021).

Une étude de polymorphisme terminal de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S a montré la présence des mêmes genres des endophytes sur plusieurs génotypes de maïs (Johnston-Monje et Raizada, 2011). D'autres études ont signalé une présence continue de souches endophytes particulières à travers les générations dans le riz et le maïs (Mukhopadhyay et al., 1996 ; Liu et al., 2012), soutenant également l'idée du transfert de

génération en génération des endophytes colonisant les semences. Les bactéries endophytes des semences peuvent améliorer la germination des graines, promouvoir la santé des semis, améliorer la croissance des plantes et atténuer le stress. Ces capacités peuvent être attribuées à la production d'enzymes extracellulaires, de phytohormones et de métabolites secondaires. Compte tenu des propriétés de promotion de la croissance et de lutte biologique de ces microbes, ceux-ci peuvent donc être appliqués en tant que biofertilisants et en bioremédiation (Shahzad et al., 2018).



**Figure 5.** Résumé schématique des voies de colonisation et des déterminants, des modes de transmission et des fonctions des bactéries endophytes des semences. Après la germination des semences, la communauté bactérienne végétale est établie à partir des endophytes des semences et des bactéries présentes dans l'environnement extérieur. Certaines de ces bactéries pourraient être transférées à la prochaine génération de plantes *via* les semences. Cela conduit non seulement à la dispersion des bactéries, mais assure également le transfert de caractéristiques bactériennes bénéfiques à la prochaine génération de plantes (Truyens et al., 2015).

### **1.3.2. Transmission horizontale**

La transmission horizontale de bactéries aux plantes est la capacité à recruter un ensemble diversifié de symbiotes de l'environnement en fournissant un moyen pour répondre à un environnement en évolution (Carroll, 1988). La diversité des bactéries dans les semences et les jeunes plantules dans des conditions stériles est généralement inférieure à la diversité des bactéries des plantes cultivées dans le sol (Hardoim et al., 2012), suggérant que la majorité des endophytes sont acquises de l'environnement (Figures 4 et 5). Les endophytes bactériens ont généralement un large spectre d'hôte vu qu'ils peuvent coloniser des taxons de plantes très éloignés (Ma et al., 2011 ; Compant et al., 2005 ; Khan et al., 2012). Les plantes apparaissent capables d'accueillir une grande diversité d'endophytes qui dépend de l'environnement de la plante (par exemple, le type de sol) et de son génotype (Schlaeppi et Bulgarelli, 2015 ; Edwards et al., 2015).

### **1.3.3. Processus de colonisation des plantes par les bactéries endophytes**

Le processus de colonisation implique une communication complexe entre la plante et les microorganismes. Le processus de colonisation des racines, nécessite la reconnaissance de composés spécifiques dans les exsudats racinaires par les bactéries endophytes (Compant et al., 2005 ; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006). La colonisation endophytique implique une série de facteurs environnementaux et génétiques permettant la pénétration de l'endosphère végétale (Compant et al., 2010). Les associations hôte-bactéries peuvent impliquer des interactions et des processus de reconnaissance spécifiques. La composition des exsudats dépend du cultivar, de l'exposition de la plante au stress, du stade de croissance de la plante et peut également présenter des différences le long de la structure racinaire entraînant des différences dans la composition des diverses communautés bactériennes (Haichar et al., 2008). Les différences dans la composition de l'exsudat racinaire peuvent également influencer le processus de colonisation (Lugtenberg et al., 2001). De plus, certains exsudats sont connus pour avoir des effets négatifs sur les souches bactériennes. Les différences entre les composés attractifs ou répulsifs qui affectent la colonisation bactérienne sont susceptibles d'avoir un effet sur l'expression des gènes bactériens (Bais et al., 2006). En plus de la chimiotaxie des exsudats et des activités de mucilage ou de lutte biologique, des caractéristiques telles que les flagelles bactériens, le quorum sensing (aptitude d'un microorganisme à détecter la densité de population de ce microbe) ainsi que la production de composés / enzymes spécifiques sont impliquées dans les processus de colonisation. Les

flagelles permettent aux bactéries d'entrer en contact avec les exsudats et les composants du mucilage des racines et la chimiotaxie provoquée par les flagelles peut donc jouer un rôle important dans la colonisation des racines (Compant et al., 2010).

Une fois à l'intérieur des racines, les bactéries endophytes peuvent coloniser systématiquement les tissus végétaux adjacents. Bien que les bactéries endophytes pénètrent généralement dans les plantes à travers les racines, les parties aériennes des plantes, y compris les tiges, les feuilles, les fleurs et les cotylédons peuvent également constituer des voies de pénétration (Lugtenberg, 2015).

#### **1.3.3.1. Colonisation de la rhizosphère par les bactéries endophytes**

L'utilisation des systèmes de détection bactérienne basés sur l'utilisation d'immuno-marqueurs comme les GFP / Gus A, et l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) a révélé que les cellules bactériennes colonisent d'abord la rhizosphère, c'est-à-dire la région du sol directement impactée par les racines et leurs microorganismes associés (Gamalero et al., 2004). La population de bactéries rhizosphériques peut varier entre  $10^6$ - $10^9$  cellules bactériennes par gramme du sol de la rhizosphère (Bulgarelli et al., 2013). Celles-ci se fixent aux surfaces radiculaires pour former une chaîne de cellules (Hansen et al., 1997). Elles peuvent ainsi coloniser toute la surface racinaire (Benizri et al., 2001). Des traits bactériens comme la motilité et la production de polysaccharides jouent un rôle important dans la colonisation de la rhizosphère végétale (Santoyo et al., 2016).

#### **1.3.3.2. Colonisation des racines par les bactéries endophytes**

Après la colonisation de la rhizosphère et du rhizoplan (surface externe des racines), les bactéries endophytes poursuivent leur chemin vers l'intérieur de la racine de la plante. La colonisation des racines des plantes est contrôlée par différents facteurs. Ces facteurs comprennent (i) la fixation et la motilité bactérienne, (ii) le quorum sensing (QS) qui est un processus de communication cellule-cellule bactérienne qui implique la production, la détection et la réponse aux molécules de signalisation extracellulaire appelées auto-inducteurs (AI) (Rutherford et al., 2012), (iii) le taux de croissance bactérien, (iv) la minimisation de la concurrence par la production des substances antagonistes (Compant et al., 2010) (Figure 6). Pour réussir la colonisation, les bactéries doivent entre autre s'adapter métaboliquement aux nutriments disponibles dans les tissus racinaires de la plante (Matilla et al., 2007).

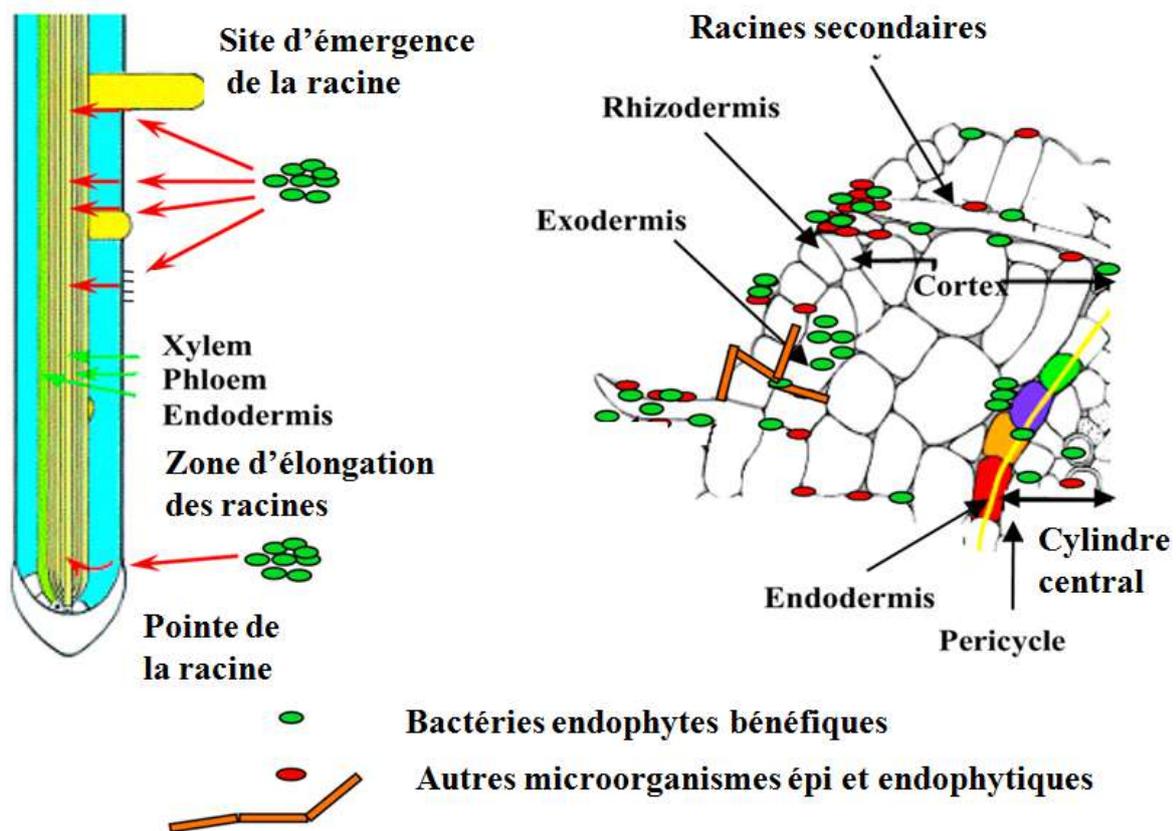
Le processus de pénétration dans l'hôte peut être passif ou actif. Une pénétration passive peut se produire à travers les blessures au niveau de la racine et les zones d'émergence des racines et les pointes racinaires (Hardoim et al., 2015). La pénétration active par les bactéries endophytes compétentes est réalisée au moyen d'un mécanisme complexe comportant la reconnaissance, la motilité, l'attachement, la formation de biofilm, la pénétration et l'invasion des tissus. En effet, les bactéries peuvent atteindre les sites d'entrée des racines, comme les émergences racinaires latérales et blessures, en utilisant la motilité de contraction médiée par les pili (fibres de surface dynamiques) de type IV. Ce processus a été observé chez les bactéries endophytes diazotrophiques *Azoarcus sp.* BH72 colonisant les racines de riz (Böhm et al., 2007). Néanmoins, chaque bactérie endophyte a son propre modèle de colonisation (Zachow et al., 2010). Cela implique l'adhésion bactérienne aux structures de surface cellulaire, qui est médiée par des polysaccharides, les pili et les adhésines bactériennes (Hori and Matsumoto, 2010; Serrato et al., 2010). De plus, la sécrétion d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, sont connues pour être impliquées dans la pénétration bactérienne et la propagation dans la plante (Compant et al., 2005). Les gènes codant les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire existent largement dans les génomes des bactéries endophytes (Straub et al., 2013). En effet, Sessitsch et al. (2012) ont montré que les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation des polymères végétaux telles que les cellulases, xylanases, cellobiohydrolases, endoglucanase et des protéines liantes à la cellulose ont été détectées dans le métagénome des communautés endophytiques bactériennes de la racine du riz. Reinhold-Hurek et al. (2006) ont prouvé que les endoglucanases sont cruciales pour *Azoarcus sp.* pour pouvoir coloniser les tissus racinaires du riz. Pour pouvoir pénétrer intracellulairement, les endophytes bactériens peuvent aussi sécréter des pectinases pour dégrader la paroi des cellules végétales. Il a été constaté que la pectinase est déterminante dans le processus d'infection précoce de *Bradyrhizobium sp.* SUTN9-2, bactérie formant des relations symbiotiques avec les légumineuses *Aeschynomene americana* (Piromyou et al., 2015). La colonisation racinaire médiée par Quorum Sensing a été démontrée avec un mutant de *P. fluorescens* 2P24 portant une mutation dans un gène de la famille LuxR-LuxI (gènes qui régulent des fonctions diverses telles que la synthèse d'exoenzymes, la conjugaison, la production d'antibiotiques, la luminescence et la formation de biofilm par les bactéries (Gray et Garey, 2001)) (Wei et Zhang, 2006). Un mutant *pcoI* de *P. fluorescens* 2P24 a montré une réduction de la formation de biofilm et de la colonisation des racines ainsi qu'une diminution de l'activité de lutte biologique contre *Gaeumannomyces graminis* attaquant le blé (Wei et Zhang, 2006). Le Quorum sensing affecte donc la capacité compétitive des souches bactériennes, influençant

d'avantage leur colonisation de la rhizosphère dans des conditions naturelles (Compant et al., 2010). Des études ont montré que les mutants de *Serratia liquefaciens* ou *Serratia plymuthica*, qui ne produisent pas de N-acyl homosérine lactones (AHL) (médiators du Quorum sensing chez les bactéries Gram négatif), ne différaient pas dans leur capacité de colonisation des racines de tomate et de colza (Schuhegger et al., 2006; Müller et al., 2009).

De plus, une autre façon par laquelle les bactéries endophytes évitent d'être détectées comme agent pathogène par la plante est le maintien d'une faible densité cellulaire par rapport aux bactéries pathogènes (Zinniel et al., 2002). Par conséquent, la présence des bactéries endophytes est déterminée par des facteurs de hasard et des déterminants génétiques bactériens qui permettent l'interaction plante-bactéries (Hardoim et al., 2008). L'hôte végétal joue également un rôle essentiel dans la sélection d'un partenaire endophyte, où la sécrétion d'exsudats racinaires spécifiques et une réponse sélective de défense des plantes sont considérées comme des facteurs importants dans la sélection d'endophytes spécifiques (Rosenblueth et Martínez-Romero, 2006).

En outre, Kost et al., (2013) ont constaté que l'oxalotrophie, c'est-à-dire la capacité d'utiliser l'oxalate comme source de carbone, est nécessaire pour réussir la colonisation de *Burkholderia phytofirmans* PsJN sur le lupin et le maïs. L'oxalotrophie a été signalée être associée uniquement à des espèces de *B. phytofirmans* bénéfiques pour les plantes, les espèces du genre *Burkholderia* pathogènes pour les végétaux ou pathogènes opportunistes pour les humains ne peuvent pas utiliser l'oxalate (Kost et al., 2013). Cette étude suggère un rôle de l'oxalate chez les végétaux pour sélectionner des endophytes bénéfiques, tout en évitant les agents pathogènes bactériens provenant des communautés bactériennes complexes du sol.

Dans l'ensemble, les traits discutés ci-dessus semblent être nécessaires pour l'invasion active et la transmission systémique des bactéries endophytes à l'intérieur des plantes. Après leur entrée dans les racines, les bactéries endophytes peuvent se propager de manière systémique pour coloniser les tissus aériens. Chez les plantes, les racines latérales émergentes traversent l'épiderme, le cortex, l'endoderme, la bande casparienne (bande autour de l'endoderme) et le péricycle, formant ainsi naturellement une voie d'entrée pour les bactéries pour entrer sur ces sites. Les bactéries peuvent encore pénétrer davantage *via* les vaisseaux du phloème et du xylème (Compant et al., 2010). Les bactéries colonisant l'intérieur des tissus conducteurs peuvent être entraînés vers les pousses et les feuilles par la transpiration des plantes (Compant et al., 2010).

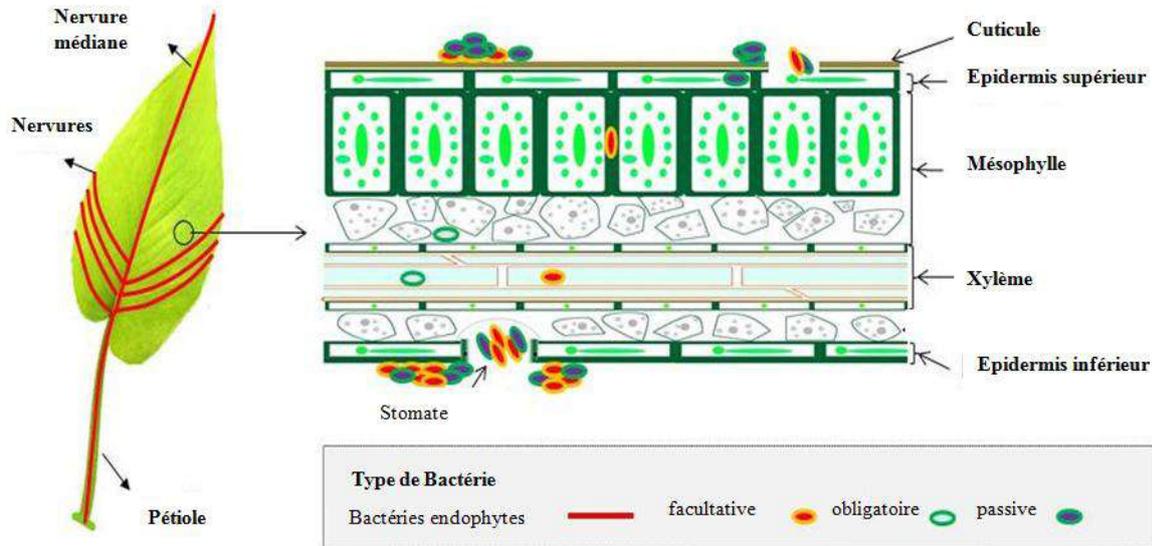


**Figure 6.** Les sites de colonisation des plantes par les bactéries endophytes (Compant et al 2010). Les bactéries endophytes colonisent les racines avec une densité de communauté bactérienne entre  $10^3$ – $10^4$  (cfu/gramme de poids frais de tissus) dans des conditions naturelles (Compant et al., 2010).

### 1.3.3.3. Colonisation des parties aériennes par les bactéries endophytes

Certaines bactéries colonisent aussi les parties aériennes des plantes. Provenant des populations d'épiphytes de la phyllosphère (ensemble des organes aériens considéré comme habitat pour les microorganismes), elles pénètrent par des ouvertures naturelles (stomates et hydathodes), et les blessures générées par le vent, les insectes et les agents pathogènes (Vorholt, 2012). Dans une feuille, les bactéries peuvent coloniser les cellules de l'épiderme supérieur, les cellules du mésophylle palissadé, les vaisseaux du xylème ainsi que des espaces intercellulaires (Olivares et al., 1997) (Figure 7). Des bactéries endophytes ont été isolées des organes reproducteurs, comme les fleurs, les fruits et les graines des plantes, mais en faible densité (Rosenblueth et Martínez-Romero, 2006; Compant et al., 2011; Truyens et al., 2015). Conformément à cela, Compant et al. (2011) ont visualisé la colonisation de *Pseudomonas spp.* et *Bacillus spp.* dans la vigne en utilisant l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et

ont trouvé que ces bactéries colonisent l'épiderme et le xylème, les espaces intercellulaires des cellules pulpaies et le long des parois cellulaires à l'intérieur des graines. Un autre exemple est la souche *Streptomyces mutabilis* IA1 qui contrôle le champignon pathogène *Fusarium culmorum* dans les semis de blé et qui colonise la zone à l'intérieur du caryopse, jusqu'à la couche d'endocarpe des graines de blé (Toumatia et al., 2016).



**Figure 7.** Représentation schématique des modèles de colonisation bactérienne dans une feuille. L'image ci-contre montre que la présence de bactéries a été détectée dans le pétiole, la nervure médiane et les nervures des feuilles. L'image montre à droite une coupe transversale de feuille agrandie, ce qui démontre que les bactéries endophytes peuvent non seulement coloniser l'apoplaste mais elles sont également présentes au niveau intracellulaire (Liu et al., 2017).

#### 1.4. Classification et diversité des bactéries endophytes

##### 1.4.1. Facteurs affectant la diversité des bactéries endophytes dans les plantes

Les communautés bactériennes colonisant les plantes sont influencées par divers facteurs biotiques et abiotiques incluant le pH, la salinité, le type, la structure, l'humidité et la composition organique du sol ainsi que les exsudats libérés par la plante (Fierer, 2017). Des facteurs comme l'environnement extérieur, y compris le climat, la présence d'agents pathogènes et les pratiques humaines peuvent aussi influencer le microbiote des plantes. Le génotype et l'espèce végétale ainsi que la morphologie des racines jouent un rôle important dans le recrutement des bactéries par la plante (Reinhold-Hurek et al., 2015 ; Hartmann et al., 2009; Ladygina et Hedlund, 2010; Chaparro et al., 2014). Par exemple, des espèces végétales

poissant dans un sol similaire peuvent héberger des communautés bactériennes significativement différentes (Hacquard et al., 2016; Samad et al., 2017 ; Aleklett et al., 2015). D'autres facteurs peuvent intervenir comme l'âge et le stade de développement de la plante (Reinhold-Hurek et al., 2015 ; Aleklett et al., 2015) ainsi que leur système d'immunité (Bulgarelli et al., 2015).

#### **1.4.2. Diversité des bactéries endophytes dans les plantes**

Plusieurs outils moléculaires ont été utilisés pour identifier les espèces formant le microbiote bactérien comme le séquençage du gène de l'ARNr 16S, la PCR en temps réel ainsi que les méthodes métagénomiques (Liu et al., 2017). Les plantes hébergent une multitude de genres et d'espèces bactériens. Les bactéries appartenant au phylum des protéobactéries sont les plus fréquemment isolées des plantes, y compris les classes  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -Protéobactéries, avec les  $\gamma$ -Protéobactéries sont les plus diverses et dominantes (Santoyo et al., 2016). Les actinobactéries et les firmicutes sont parmi les classes les plus courantes comme endophytes (Miliute et al., 2015). D'autres classes telles que les acidobactéries, les planctomycètes et les verrucomicrobies sont les moins abondantes (Liu et al., 2017). Les genres bactériens les plus couramment isolés sont les *Bacillus*, les *Burkholderia*, les *Microbacterium*, les *Micrococcus*, les *Pantoea*, les *Pseudomonas*, les *Enterobacter* et les *Paenibacillus*, où *Bacillus* et *Pseudomonas* sont les genres prédominants (Miliute et al., 2015 ; Santoyo et al., 2016) (**Tableau 1**).

**Tableau.1.** Genres des bactéries endophytes communs isolés de plantes cultivées (Miliute et al., 2015).

<b>Plantes</b>	<b>Genres des bactéries endophytes</b>
Luzerne	<i>Bacillus, Erwinia, Microbacterium, Pseudomonas, Salmonella</i>
Banane	<i>Azospirillum, Burkholderia, Citrobacter, Herbaspirillum, Klebsiella</i>
Piment noir	<i>Arthrobacter, Bacillus, Curtobacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Serratia</i>
Canola	<i>Acidovorax, Agrobacterium, Aureobacterium, Bacillus, Chryseobacterium, Cytophaga, Flavobacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Rathayibacter,</i>
Carotte	<i>Agrobacterium, Bacillus, Klebsiella, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella, Staphylococcus</i>
Trèfle	<i>Agrobacterium, Bacillus, Methylobacterium, Pseudomonas, Rhizobium</i>
Cotton	<i>Bacillus, Burkholderia, Clavibacter, Erwinia, Phyllobacterium, Pseudomonas</i>
Concombre	<i>Agrobacterium, Bacillus, Burkholderia, Chryseobacterium, Clavibacter, Curtobacterium, Enterobacter, Micrococcus, Paenibacillus, Phyllobacterium, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomonas</i>
Grapevine	<i>Comamonas, Enterobacter, Klebsiella, Moraxella, Pantoea, Pseudomonas, Rahnella, Rhodococcus, Staphylococcus, Xanthomonas</i>
Maïs	<i>Achromobacter, Agrobacterium, Arthrobacter, Bacillus, Burkholderia, Corynebacterium, Curtobacterium, Enterobacter, Erwinia, Herbaspirillum,</i>
Ananas	<i>Microbacterium, Micrococcus, Paenibacillus, Phyllobacterium, Pseudomonas, Rhizobium, Serratia, Azospirillum, Burkholderia</i>
Pomme de terre	<i>Acidovorax, Acinetobacter, Actinomyces, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Capnocytophaga, Chryseobacterium, Comamonas, Corynebacterium, Curtobacterium, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Leuconostoc, Methylobacterium, Micrococcus, Paenibacillus, Pantoea, Pseudomonas, Psychrobacter, Serratia, Shewanella, Sphingomonas, Stenotrophomonas, Streptomyces, Vibrio, Xanthomonas</i>
Radis	<i>Proteobacteria, Salmonella</i>

---

Trèfle des près	<i>Acidovorax, Agrobacterium, Arthobacter, Bacillus, Bordetella, Cellulomonas, Comamonas, Curtobacterium, Escherichia, Klebsiella, Methylobacterium, Micrococcus, Pantoea, Pasteurella, Phyllobacterium, Pseudomonas, Psychrobacter, Rhizobium, Serratia, Sphingomonas, Variovorax, Xanthomonas</i>
Riz (spontané et cultivé)	<i>Agrobacterium, Azoarcus, Azorhizobium, Azospirillum, Bacillus, Bradyrhizobium, Burkholderia, Chromobacterium, Enterobacter, Herbaspirillum, Ideonella, Klebsiella, Micrococcus, Pantoea, Pseudomonas, Rhizobium, Serratia, Stenotrophomonas</i>
Soja	<i>Erwinia, Agrobacterium, Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter, Pantoea, Bacillus</i>
Cannes sucre	à <i>Acetobacter, Gluconacetobacter, Herbaspirillum, Klebsiella</i>
Tomate	<i>Brevibacillus, Escherichia, Pseudomonas, Salmonella</i>
Blé	<i>Bacillus, Burkholderia, Flavobacterium, Klebsiella, Microbispora, Micrococcus, Micromonospora, Mycobacterium, Nocardiododes, Rathayibacter, Streptomyces</i>

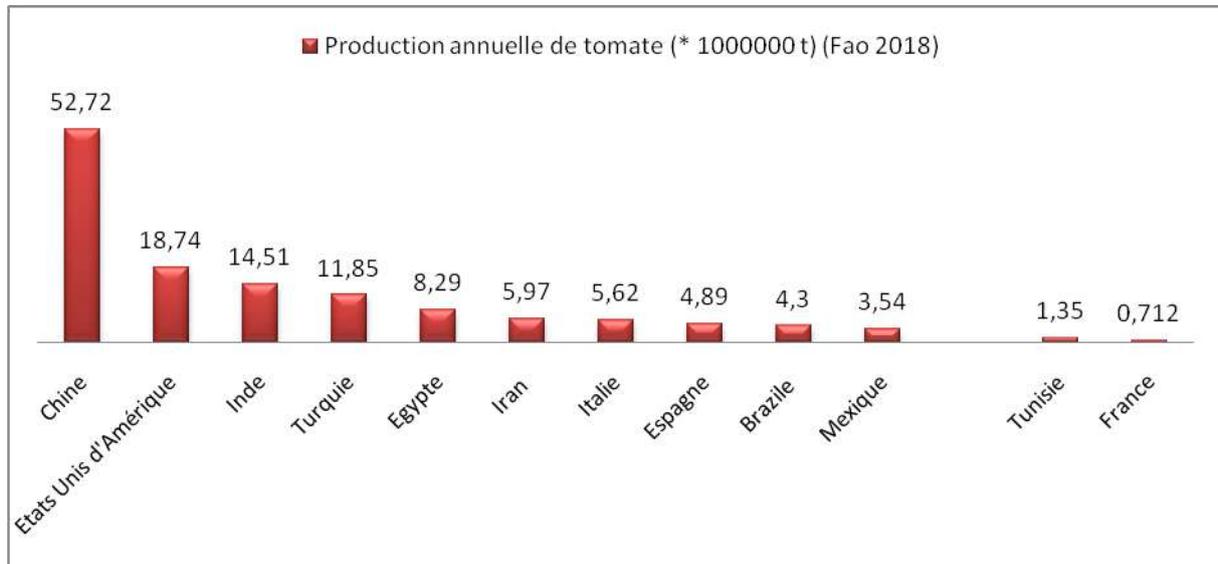
---

### 1.4.3. Diversité des endophytes chez la solanacéemodèle *Solanum lycopersicum L.*

#### 1.4.3.1. Importance de la tomate

Les solanacées sont l'une des principales familles économiquement importantes parmi les angiospermes contenant un nombre important de plantes cultivées dont la pomme de terre, la tomate, le poivre, l'aubergine, le pétunia et le tabac. La tomate cultivée, *Solanum lycopersicum L.*, est bien étudiée en termes de génétique, de génomique et de sélection et considérée un excellent modèle pour la recherche fondamentale et appliquée liée à la qualité des fruits, à la tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques (Panthee and Chen, 2009; Sahu et al., 2012; Gupta et al., 2013). Elle se classe deuxième derrière la pomme de terre en termes de production (FAOSTAT 2010). Actuellement, la Chine, les États-Unis d'Amérique et l'Inde sont les principaux pays producteurs de tomates avec respectivement, 56, 308, 910 tonnes/an, 18 ,399,000 tonnes/an et 13, 038,410 tonnes/an (FAOSTAT 2018). La Tunisie et

la France produisent annuellement plus de 1, 357, 621 tonnes et 712,019 tonnes de tomates (FAOSTAT 2018).



**Figure 8.** Représentation schématique de la production annuelle des tomates dans le monde (d'après les FAOSTAT 2018).

Les maladies sont l'un des principaux problèmes de la culture de la tomate dans le monde entier, et la sensibilité de la tomate à de nombreux micro-organismes pathogènes conduit à une utilisation intense des produits agrochimiques (Gajanana et al., 2006). Ainsi, les agents de lutte biologique sont apparus comme approche alternative pour le contrôle des maladies des tomates comme le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* (Chen et al., 2013) et les maladies fongiques comme la pourriture grise causée par *B.cinerea* (Kefi et al., 2015). De cette façon, une amélioration des connaissances sur l'écologie des communautés microbiennes associées aux plants de tomates contribuera à déterminer le potentiel des candidats pour le contrôle biologique des maladies des tomates et la promotion de la croissance des plantes.

#### 1.4.3.2. Diversité phylogénétique des endophytes bactériens de la tomate

Une étude de Romero et al. (2014) basée sur le pyroséquençage de l'ADNr 16S des communautés bactériennes endophytiques colonisant les feuilles de la tomate a montré que les Protéobactéries constituent le phylum le plus dominant avec 94,41%, puis les actinobactéries avec 1,47%, les Planctomycètes avec 1,38%, les Verrucomicrobia avec 1,06%, les Acidobactéries avec 0,44% et d'autres phyla 1,25%. Parmi les Protéobactéries, les Alpha-

protéobactéries sont les plus abondantes (84,12%) suivies des Beta-protéobactéries (11,83%) puis des Delta-protéobactéries (2,78%) et des Gamma-protéobactéries (1,27%). Parmi les genres des bactéries colonisant les tissus de la tomate, on distingue les *Brevibacillus*, les *Escherichia*, les *Pseudomonas* et les *Salmonella* (Miliute et al., 2015) (Tableau 2).

L'analyse des communautés bactériennes associées aux plants de tomates est intéressante non seulement en raison de l'importance de la tomate comme plante cultivée, mais aussi pour la contribution potentielle à démêler les mécanismes qui régulent la colonisation des plantes cultivées par des micro-organismes bénéfiques. Par exemple, quelques ouvrages ont décrits la diversité bactérienne associée aux feuilles de tomate, en analysant les communautés phyllosphériques sans discrimination entre les bactéries épiphytes et endophytes (Enya et al., 2007a, b) ou en se focalisant uniquement sur les communautés épiphytes (Correa et al., 2007). Cependant, une analyse complète de la diversité bactérienne des endophytes de tomate et de la capacité des bactéries du sol à coloniser de manière endophytique les différents tissus des plants de tomates n'a pas été réalisée.

#### **1.4.4. Diversité des endophytes chez la plante modèle *Medicago truncatula***

##### **1.4.4.1. Importance des légumineuses**

La famille des Fabaceae (légumineuses) est parmi les plus grandes familles de plantes à fleurs dans le monde avec 19 400 espèces classées dans environ 730 genres dont les plus répandus sont les Astragales (2 400 espèces), les Acacia (950 espèces), les Indigofera (700 espèces), les Crotalaria (700 espèces), et les Mimosa (500 espèces) (Rahman and Parvin, 2014). La famille des légumineuses est l'un des plus importants groupes de plantes, car elles sont utilisées par l'homme sous forme d'aliments, d'engrais verts et de fourrages. Selon la FAO (2018), la production en légumineuses comestibles approche les 60 millions de tonnes annuellement. La production annuelle de haricots secs par exemple est de 23 millions de tonnes, celle du pois chiches est de 9 millions de tonnes, 47,5 millions de tonnes de fèves, 2,8 millions de tonnes de lentilles par an, 16 millions de tonnes de petit pois. *Medicago sativa* est l'une des légumineuses fourragères les plus cultivées au monde. C'est une culture économiquement importante utilisée comme fourrage pour le bétail. Cette espèce est cultivée depuis l'Antiquité. En raison de sa haute valeur nutritive, les anciens l'appelaient alfac-facah (le père de tous les aliments) et de nos jours on l'appelle souvent «la reine des fourrages». Parmi les légumineuses, la luzerne est la plante avec le rendement le plus élevé en protéines brutes: 2000–3000 kg / ha, soit 3 fois plus que le soja et 4 fois plus que le blé (Rafińska et al.,

2017). Selon les données de 2009, la culture mondiale de la luzerne a atteint 32 millions d'hectares (Bresson et al., 2009).

#### **1.4.4.2. Diversité phylogénétique des endophytes bactériens des légumineuses**

Il y a beaucoup de rapports sur la présence de bactéries endophytes dans les racines et les nodules des légumineuses comme *Medicago sativa*, *M.truncatula*, *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum*, *Trifolium*, *Vigna unguiculata subsp. unguiculata*, *Pisum sativum*, *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Acacia*, *Argyrolobium*, *Conzattia*, *Trigonella foenum-graecum*, *Hedysarum coronarium*, *Kennedia*, *Leucaena leucocephala*, *Nelumbo nucifera*, *Vigna radiata*, *Melilotus officinalis*, *Ornithopus sativus*, *Onobrychis viciifolia*, *Oxytropis neglecta*, *Psoralea*, *Scorpiurus*, *Sesbania*, *Tetragonolobus* et *Vicia*. Les bactéries isolées des tissus des légumineuses comprennent les genres suivants : *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Sphingomonas*, *Inquilinus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus*, *Bosea*, *Rhodopseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Starkeya*, *Agromyces*, *Ornithinococcus*, *Actinobacterium*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Pedobacter*, *Aerococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Dyella* et d'autres. La colonisation des bactéries endophytes ne se limite pas à une seule espèce végétale mais comprend plusieurs genres et espèces (Muresu et al., 2008; Dudeja et al., 2012 ; Surjit and Rupa, 2014 ; Chihaoui et al., 2015; Ferchichi et al., 2019).

Plusieurs études ont caractérisé les communautés bactériennes colonisant les différents tissus de *Medicago sativa* montrant que la plupart des bactéries isolées appartiennent aux espèces suivantes *Bravibacillus chosinensis*, *Bacillus megaterium*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella*, *Azospirillum* sp. B510, *Sinorhizobium meliloti* (Mrabet et al., 2011 ; Dudeja et al., 2012). Tandis que la luzerne pérenne est bien étudiée au niveau de la caractérisation des ses communautés endophytes, les études sur les luzernes annuelles ne sont pas nombreuses. Yaish et al. (2016) ont récemment comparé des communautés bactériennes colonisant les racines de *M. truncatula* en condition normale et sous stress salin. Des données de séquençage l'ADNr 16S ont prouvé que les bactéries isolées appartiennent au phylum des Protéobactéries. Ce phylum comprend 14 familles différentes dont les Chromatiaceae, les Enterobacteriaceae, les Pseudomonadaceae et les Rhizobiaceae, des Actinobactéries et Bacteroidetes (y compris les genres : Flavobactéries et Sphingobactéries). L'enrichissement par les alpha-protéobactéries était élevé au sein de la communauté isolée des racines cultivées dans des conditions normales. Cependant, les Gamma-proteobactéries et les Bêta-protéobactéries étaient plus abondantes chez les plantes

cultivées en condition de stress salin. De plus, le traitement par le sel conduit à l'apparition des classes de Flavobactéries et Streptomycetales et à la disparition des classes de Sphingobactéries dans la communauté des bactéries endophytes (Yaish et al.2016).

## **2. Effet des bactéries endophytes sur les plantes**

### **2.1 Besoin de nouvelles stratégies pour l'amélioration de la production des plantes**

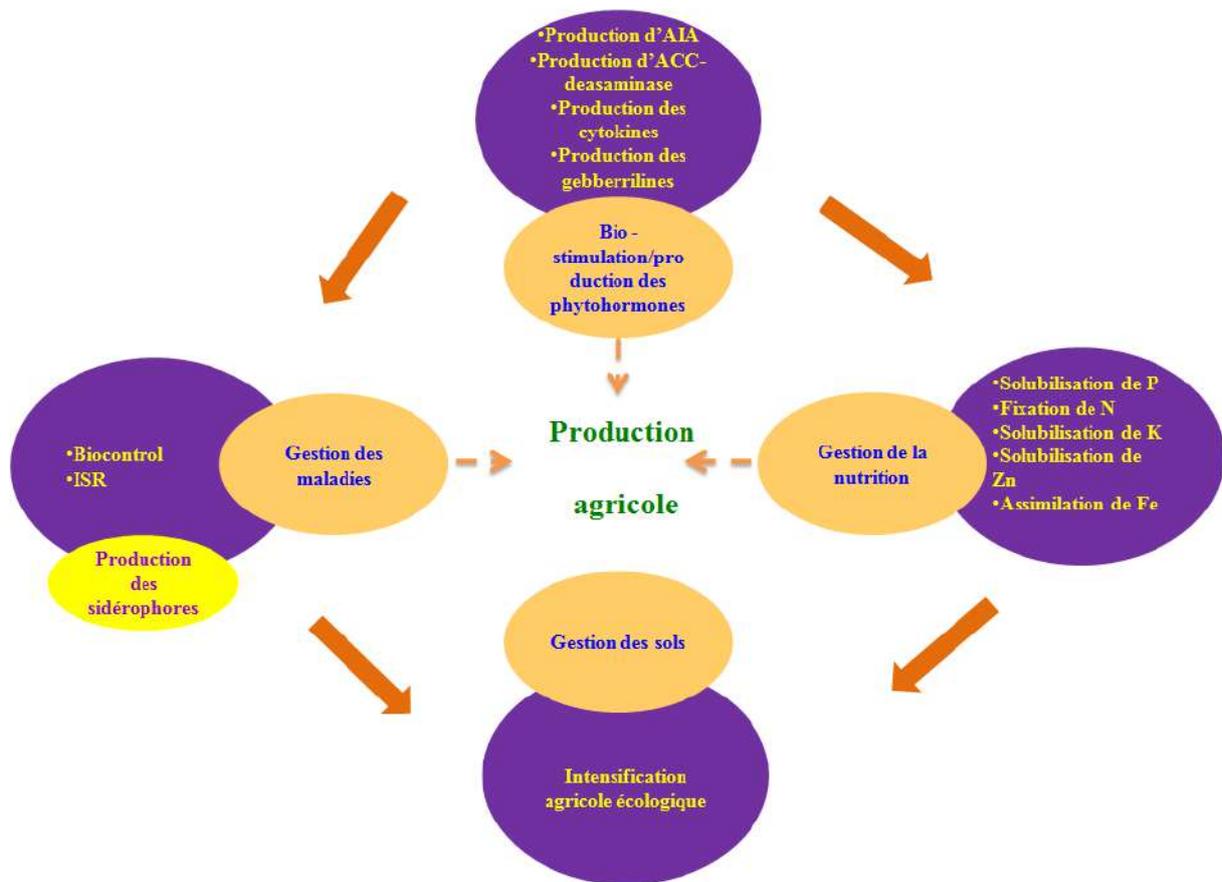
La population mondiale est en accroissement constant et devrait atteindre près de 10 milliards d'habitants en 2050 par rapport à la situation actuelle (7,7 milliards d'habitants selon l'Organisation des Nations Unis (ONU) en 2020). Cette augmentation de la population mondiale constitue l'un des défis économiques et scientifiques du monde actuel vu que les niveaux actuels de la production alimentaire ne répondent pas à la demande future des habitants de la planète. L'agriculture est d'autant plus affectée par les changements climatiques et les pratiques agricoles intensifiées contribuent directement à la détérioration des sols et affectent ainsi négativement la sécurité alimentaire mondiale future.

Le système agricole actuel est basé sur l'utilisation excessive d'engrais et de pesticides ainsi que l'irrigation abondante (Matson et al., 1997). Ces pratiques ne font qu'affecter négativement l'équilibre nutritionnel et la dynamique microbienne du sol. Des alternatives aux produits chimiques qui reposent en partie sur l'utilisation des composts organiques et des bio-fertilisants, peuvent aider à l'augmentation de la production agricole et minimiser les dommages écologiques (Matson et Vitousek 2006). L'agriculture moderne s'oriente vers des nouvelles stratégies qui reposent sur l'adoption de méthodes capables d'augmenter la production alimentaire avec un impact moindre sur l'environnement. Ce processus est connu sous le nom de l'Intensification Agricole Ecologique (IAE), terme utilisé pour la première fois par Dugué et al. (2012). Ce processus vise à produire plus de nourriture par unité d'intrant tout en minimisant l'impact négatif sur l'environnement. Ainsi l'exploitation des bactéries bénéfiques du sol et qui colonisent les tissus végétaux peut contribuer à l'intensification agricole écologique. Ces micro-organismes peuvent être exploités principalement pour maintenir la fertilité naturelle des sols et la gestion des stress abiotiques et biotiques des plantes (Lee and Luan, 2012) (Figure 9). L'association des endophytes avec les plantes a une grande importance écologique, les endophytes sont connus pour améliorer la croissance et le rendement des plantes en fixant l'azote atmosphérique, en solubilisant le phosphore, en produisant des phytohormones (cytokinines, auxines et gibbérellines), ou encore des sidérophores, et en contribuant ainsi à l'amélioration de l'alimentation minérale des plantes

hôtes et à la lutte contre les agents pathogènes (Afzal et al., 2019). Ainsi, l'exploitation des interactions endophyte – plante peut entraîner la promotion de la croissance et la protection des plantes et peut jouer un rôle important dans les applications d'agriculture durable.

Des études ont prouvé la capacité des endophytes bactériens à augmenter la performance des plantes et l'augmentation de leur productivité, y compris sous contraintes biotiques. Ainsi, des essais sur le terrain ont montré que les actinobactéries endophytes du blé ont augmenté significativement l'émergence des plantes et les rendements du blé infecté par *R. solani* et *Pythium spp.*, par rapport au témoin non traité. Les souches endophytes les plus efficaces ont montré des résultats cohérents sur trois ans et ce, en utilisant différents cultivars de blé dur et d'orge. En l'absence de pression de la maladie, l'augmentation du rendement en grains a été de 60% ce qui récompense les coûts associés à l'application de l'inoculum microbien (Franco et al., 2007). Pedraza et al. (2009) ont observé que le rendement en grains du riz a augmenté après l'inoculation par la souche *Azospirillum S1* de 18,92% par rapport au contrôle. L'expérience sur le terrain menée par Tiwari et al. (2010) pour évaluer la performance de deux souches endophytes isolées des feuilles de *Ocimum sanctum* (Tulsi ou basilic sacré) sur sa croissance et son rendement a clairement indiqué que ces endophytes ont le potentiel d'augmenter le rendement total en herbes.

Les endophytes colonisent pratiquement toutes les plantes supérieures poussant dans divers environnements extrêmes (Vaishnav et al., 2019).



**Figure 9.** Représentation schématique globale de l'intensification agricole écologique (IAE) par les endophytes et leurs mécanismes d'action (Dheeman et al., 2017).

## 2.2 . Mécanismes de promotion de la croissance de plantes par les bactéries endophytes

Plusieurs études ont montré que les bactéries endophytes ont plusieurs effets bénéfiques sur leur plante hôte (Miliute et al., 2015 ; Santoyo et al., 2016 ; Afzal et al., 2019). Les bactéries endophytes améliorent la croissance des plantes (phytostimulation, production de phytohormones et biofertilisation) (Zaidi et al., 2017), protègent contre les bioagresseurs (production des sidérophores et des métabolites antimicrobiens) et induisent la résistance systémique (Singh et al., 2016; Liu et al., 2020). Une étude faite par Kumar et al. (2020) nous a donné une vue globale de l'ensemble de différentes bactéries endophytes isolées de différentes plantes et ayant différents mécanismes de promotion de croissance des plantes (Tableau 2).

**Tableau 2.** Bactéries endophytes bénéfiques associées à différentes plantes et leurs propriétés favorisant la croissance des plantes (Kumar et al., 2020).

<b>Bactéries endophytes</b>	<b>Plantes</b>	<b>Activités</b>	<b>Organe d'origine</b>	<b>Références</b>
<i>Acinetobacter</i> sp. ALEB16	<i>Atractylodes lancea</i>	Activation de l'accumulation des huiles volatiles des plantes, induction de la production de l'acide abscissique et de l'acide salicylique	Feuilles	Wang et al. (2015)
<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>subsp. faecalis</i> str. S8	<i>Withania somnifera</i>	Production de L'acide indole acétique et solubilisation du phosphate	Tiges et fruits	Singh et al. (2019)
<i>Arthrobacter</i> sp. SMR3, <i>B. subtilis</i> SMR15	<i>Papaver somniferous</i>	Biosynthèse des Benzylisoquinoline alcaloïde (BIA), des AIA, ACC déaminase	Racines, Feuilles, capsules, et graines	Pandey et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i> LK14	<i>Moringa peregrina</i>	Solubilisation du phosphate, production de l' ACC déaminase et de phosphatase acide	Ecorces	Latif Khan et al. (2016)
<i>Pantoea ananatis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Brevibacillus agri</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	<i>Oryza sativa</i>	Solubilisation du phosphate	Feuilles, Tiges, and Racines	Matos et al. (2017)
<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bauhinia purpurea</i>	Activité antioxydante et antimicrobienne	Tiges, Feuilles et fleurs	Sunkar et al. (2018)
<i>Acinetobacter</i> sp. ACMS25, <i>Bacillus</i> sp. PVMX4	<i>Phyllanthus amarus</i>	Solubilisation du phosphate, production de l'AIA et les sidérophores, activité ACC déaminase et production des enzymes hydrolytiques comme la cellulase, la protéase et la pectinase	Racines	Joe et al. (2016)
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Teucrium polium</i> L.	Production de l'AIA et de l'ammonia, solubilisation du phosphate	Feuilles	Hassan (2017)
<i>Bacillus</i> sp. , <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Production de l'AIA, solubilisation du	Racines	Majeed et al. (2015)

<i>sp.</i>	<i>L.</i>	phosphate Promotion de la biomasse des plantes et accumulation du N		
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> , <i>Bacillus</i> <i>sp.</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i>	<i>Cassia tora</i> <i>L.</i>	Synthèse des phytohormones, production de l'AIA, l'ammonia, des sidérophores et du HCN et la solubilisation du phosphate	Racines	Kumar et al. (2015)
<i>Paenibacillus sp.</i> RM	<i>Tridax</i> <i>procumbens</i>	Production des métabolites secondaires et des biosurfactants, solubilisation du phosphate	Racines	Govarthanan et al. (2016)
<i>Bacillus cereus</i> (ECL1), <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> (ECL2), <i>Bacillus sp.</i> (ECL3), <i>Bacillus</i> <i>pumilis</i> (ECL4), <i>Pseudomonas putida</i> (ECL5), <i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i> (ECL6)	<i>Curcuma</i> <i>longa L.</i>	Production de l'AIA et des sidérophores et la solubilisation du phosphate	Rhizome	Kumar et al. (2016, 2017)
<i>Bacillus sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i>	<i>Phoenix</i> <i>dactylifera</i> <i>L.</i>	ACC déaminase , production de l'AIA, chélation du fer et solubilisation du potassium, du phosphore et du zinc, et production d'ammonia	Graines	Yaish et al. (2015)

### 2.2.1. Phytostimulation

De nombreuses bactéries associées aux plantes synthétisent des régulateurs de croissance des plantes telles que les hormones et les composés volatils. Les phytohormones produites par les bactéries sont principalement les cytokinines, les auxines et les gibbérellines. Pirttil (2011) a constaté que la production de phytohormones par les endophytes chez la plante est spécifique à chaque organe. Bien que les auxines aient été identifiées chez des souches bactériennes isolées de tout type d'organes des plantes, les gibbérellines ont été trouvées chez les bactéries associées aux racines et les cytokinines sont produites par les bactéries colonisant

les feuilles. D'autres substances sont produites par les bactéries endophytes pour promouvoir la croissance des plantes comme les composés volatils organiques (Bailly and Weisskopf, 2012). En 2004, Ryu et al. ont découvert que les composés volatils libérés par des souches bactériennes spécifiques de végétaux améliorent la croissance d'*Arabidopsis thaliana* et induisent la résistance systémique chez la même plante.

## **2.2.2. Production d'hormones**

### **2.2.2.1. Modulation du niveau de l'acide indole acétique**

Les auxines telles que l'acide indole-3-butérique (AIB), l'acide indole-3-acétique (AIA) ou leurs précurseurs sont produits par une large gamme de bactéries. Les études ont montré que la croissance des plantes est régulée positivement par l'AIA produit par les bactéries endophytes ; par exemple chez *Brassica juncea*, la corrélation entre l'activité des endophytes favorisant la croissance végétale et celle de production de l'auxine a été significativement positive (Asghar et al., 2002). L'AIA est impliqué dans de nombreux processus physiologiques qui comprennent la signalisation cellule-cellule, la régulation développement et l'induction de systèmes de défense des plantes. L'AIA est également impliqué dans la formation de racines latérales et l'allongement des racines, la photosynthèse et la biosynthèse des métabolites, la médiation de la résistance aux conditions de stress (Glick, 2012), et le contrôle de la synthèse d'autres hormones végétales comme l'éthylène (Woodward and Bartel, 2005).

La concentration d'auxine synthétisée par la plante détermine son effet sur la stimulation ou l'inhibition de sa propre croissance. De ce fait, l'AIA produit par les bactéries endophytes peut soit stimuler le développement racinaire dans les cas où la concentration de l'AIA de plante est sous-optimale, ou inhiber le développement des racines dans les cas où le niveau d'auxine est déjà optimal (Spaepen et al., 2007). Dans une étude faite par Metoui Ben Mahmoud et al. (2020), il a été montré que l'inoculation de l'orge par des souches de rhizobactéries produisant l'AIA contribue à réduire l'impact du stress salin et stimule le développement des racines, en améliorant l'absorption d'eau et de nutriments par les plantes.

### **2.2.2.2. Production des cytokinines et gibbérellines**

Plusieurs études ont montré que de nombreuses bactéries endophytes peuvent produire des cytokinines et des gibbérellines. Les cytokinines sont largement produites par les algues, les bactéries et les plantes supérieures. Les cytokinines contrôlent la différenciation cellulaire dans les tissus méristématiques des plantes (De Rybel et al. 2016), régulent la dominance

apicale, la division cellulaire, l'allongement des racines, la germination des graines, la différenciation des chloroplastes, le développement des fleurs et des fruits, la signalisation nutritionnelle, la sénescence foliaire et les interactions avec les phytopathogènes (Sakakibara, 2006). L'expression des gènes de la cytokinine chez plusieurs bactéries promotrices de la croissance des plantes (ou PGPB pour Plant Growth Promotion Bacteria) et sa promotion de croissance des plantes ont été prouvés. Dans ce cadre, Arkhipova et al. (2005) ont montré que la cytokinine produite par *Bacillus subtilis* a un effet positif significatif sur la croissance de la laitue. Une autre étude a porté sur la capacité d'une souche génétiquement modifiée de *Sinorhizobium meliloti* qui surproduit la cytokinine à protéger les plantes de luzerne (*M. sativa*) contre la sénescence résultant du stress de la sécheresse (Xu et al., 2012). Cette expérience a montré que les souches rhizobiennes synthétisant des niveaux élevés de cytokinine est capable d'améliorer la tolérance à la sécheresse et d'augmenter la croissance des plantes de luzerne.

Les gibbérellines (GA) comprennent un grand groupe d'acides carboxyliques diterpénoïdes tétracycliques ayant soit 19 ou 20 carbones (Dodd et al., 2010). Au total, 136 structures de gibbérellines ont été identifiées de GA1 jusqu'à GA136 (Hedden and Thomas, 2012). Seulement quatre gibbérellines ont été identifiées chez des bactéries; GA1, GA3, GA4 et GA20 (Choudhary et al., 2017), GA1 et GA4 étant les plus actifs que les autres gibbérellines (Nelson et al., 2017). Les gibbérellines sont connues pour la stimulation de la croissance et l'activation d'importants processus de croissance chez les plantes, y compris l'allongement de la tige, la germination des graines et la floraison (Zaidi et al., 2015), l'amélioration de la photosynthèse et l'augmentation de la teneur en chlorophylle (Khan et al., 2015). La production de GA a été observée dans les genres bactériens suivants *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobia*, *Azotobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Herbaspirillum seropedicae* et *Azospirillum spp.* (Kumar, 2015; Dodd et al., 2010). Cohen et al. (2009) ont étudié l'effet d'*Azospirillum lipoferum* sur des plantes de maïs traitées avec des inhibiteurs de la synthèse des gibbérellines sous condition de sécheresse et ont montré que la gibbérelline produite par la bactérie endophyte a atténué l'effet du stress sur les plantes.

### **2.2.2.3. Modulation du niveau d'éthylène et production d'ACC-déaminase**

Certaines bactéries endophytes produisent la 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) déaminase, une enzyme impliquée dans la dégradation de l'ACC, précurseur de l'éthylène ce qui réduit l'effet inhibiteur de cette enzyme sur l'élongation racinaire en cas de stress abiotique.

L'enzyme ACC-déaminase s'est révélée impliquée dans la promotion de la croissance des plantes par les bactéries (Glick, 2014). Après l'absorption par les bactéries de l'ACC exsudé par les racines des plantes, l'ACC est clivé en  $\alpha$ -kétobutyrate et en ammoniac. En présence d'une bactérie synthétisant l'ACC-déaminase, une plante exposée à des conditions de stress biotiques ou abiotiques induisant normalement des niveaux d'éthylène inhibant leur croissance, peut être protégée de l'inhibition par l'éthylène de leur croissance (Glick, 2014,2015). Hardoim et al. (2008) ont prouvé que l'activité de l'ACC-déaminase des bactéries endophytes est un facteur clé dans leur capacité à promouvoir la croissance des plantes. Ils ont avancé que la diminution des niveaux d'éthylène dans les plantes dépend de la capacité des bactéries produisant l'ACC-déaminase à cliver l'ACC avant son oxydation par l'ACC-oxydase de la plante. Dans ce contexte, les endophytes bactériens produisant l'ACC-déaminase pourraient être d'excellents promoteurs de croissance des plantes. Des preuves directes de l'implication de l'ACC-déaminase des bactéries endophytes dans la promotion de la croissance des plantes ont été démontrées pour *Burkholderia phytofirmans* PsJN, en étudiant les mutants de cette bactérie qui n'ont pas l'activité ACC-déaminase (Sessitsch et al., 2005). Ces mutants ne favorisent plus l'élongation des racines des plantules de colza. Dans le même contexte, deux bactéries endophytes producteurs d'ACC-déaminase ont été testées pour leur capacité à favoriser la croissance des plants de tomates en présence de sel (Ali et al., 2014).

### **2.2.3. Biofertilisation**

#### **2.2.3.1. Fixation de l'azote**

L'azote représente le premier élément nutritif essentiel à la croissance des plantes. Cependant, sa disponibilité est très limitée dans le sol. Les bactéries endophytes symbiotiques du genre *Rhizobium* par exemple et non symbiotiques des genres *Azospirillum*, *Azobacter*... transforment l'azote atmosphérique  $N_2$  sous forme assimilable par leurs plantes hôtes en utilisant leur nitrogénase (Montañez et al., 2012). Les bactéries non symbiotiques fixatrices d'azote comme *Azoarcus* sp.BH72, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* et *Herbaspirillum seropedicae* ont augmenté la biomasse de la plante hôte par la fixation de  $N_2$  dans des conditions contrôlées (Ak, 2014). Les endophytes fixatrices d'azote sont plus performants que les micro-organismes de la rhizosphère et contribuent à promouvoir leur croissance et à améliorer leur tolérance dans des environnements de sol limités en azote (Hurek and Reinhold-Hurek, 2003). Gupta et al. (2013) ont rapporté que les bactéries endophytes fixatrices d'azote peuvent également

améliorer le taux de fixation et d'accumulation d'azote chez les plantes poussant dans des sols pauvres en azote, par exemple les souches endophytes de *G. diazotrophicus* fonctionnent exceptionnellement bien et contribuent à l'accumulation d'azote dans les plants de canne à sucre et de pin (Carrell and Frank, 2014; Dong Zhongmin et al., 1994).

### **2.2.3.2. Assimilation du phosphore**

Bien que présent en quantité suffisante, la majeure partie du phosphore du sol est insoluble et ne peut donc pas soutenir une croissance optimale des plantes. Les bactéries endophytes peuvent augmenter la disponibilité du phosphore pour les plantes par la solubilisation des phosphates, utilisant des mécanismes comme l'acidification, la chélation, l'échange d'ions et la production d'acides organiques (Nautiyal et al., 2000). Elles peuvent également augmenter la disponibilité du phosphore dans le sol en sécrétant la phosphatase acide qui peut minéraliser le phosphore organique (Van Der Heijden et al., 2008). La capacité de solubilisation du phosphate est assurée par plusieurs bactéries endophytes. Par exemple, environ 59 % à 100% des populations d'endophytes de cactus, fraise, tournesol, soja et autres légumineuses sont des solubilisateurs du phosphate minéral (Forchetti et al., 2007; Dias et al., 2009; Palaniappan et al., 2010; Puente et al., 2009a). Puente et al. (2009b) ont étudié le rôle des bactéries endophytes solubilisant le phosphate en développant des cactus exempts de bactéries et cultivés sur des substrats contenant du phosphate minéral en présence d'endophytes ou des nutriments phosphatés en comparaison avec des plantes cultivées dans des conditions stériles. Les plantes inoculées ont bien poussé sans ajout d'éléments nutritifs, et leur croissance était comparable à celle des plantes fertilisées, alors que les cactus non fertilisés n'ont pas poussé. Cela indique que les endophytes ont favorisé la croissance des plantules même en condition de limitation de nutriments phosphatés.

### **2.2.3.3. Séquestration du fer**

Le fer est indispensable pour le fonctionnement de plusieurs processus physiologiques comme la transpiration et la respiration (Ma et al., 2016). Ainsi, il joue un rôle important dans la photosynthèse de la plante et est également impliqué dans un large éventail de différents mécanismes biosynthétiques. Cependant, la quantité du fer présent n'est souvent pas suffisante pour un rendement maximal des cultures. Malgré le fait que le fer est l'un des éléments les plus abondants à la surface de la terre, les plantes et de nombreux microbes du sol ne peuvent pas l'absorber facilement en raison de son insolubilité, sous forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Ganz 2013; Saha et al. 2013). Pour faire face à cette contrainte, les bactéries et en particulier les bactéries endophytes produisent des agents chélateurs du fer appelés sidérophores qui peuvent se lier

aux ions ferriques insolubles. Par conséquent les plantes peuvent acquérir le fer lié aux sidérophores *via* la dégradation des chélates ou l'échange de ligands au niveau des racines (Ma et al., 2016; Saha et al.2013). En règle générale, les sidérophores produits par les bactéries ont une affinité beaucoup plus élevée pour le fer que les sidérophores produits par les plantes ou les champignons (Saha et al. 2016). Les groupes fonctionnels des sidérophores microbiens sont majoritairement des hydroxamates ou des catécholates; et autres groupes tels que les carboxylates, les citrates ou l'éthylènediamine (Laschat et al., 2017). Les groupes de sidérophores les plus couramment fabriqués par les bactéries sont les catécholates (Saha et al. 2016). Marques et al. (2010) ont démontré que la production des sidérophores par les bactéries bénéfiques est fortement corrélée aux caractéristiques de croissance des plantes de maïs, notamment la promotion de la biomasse des pousses et des racines. De plus, Radzki et al. (2013) ont démontré que les sidérophores bactériens fournissaient efficacement du fer aux plantes de tomates pendant la croissance en culture hydroponique.

### **2.3. Mode indirect d'action des bactéries endophytes sur les plantes hôtes : protection contre les maladies**

Dans cette partie, on s'intéresse au rôle des micro-organismes, en particulier les endophytes, dans la dynamique des maladies des plantes. Le biocontrôle des maladies des plantes peut être défini comme l'utilisation d'antagonistes microbiens pour supprimer les maladies. Les agents de lutte biologique sont respectueux de l'environnement, améliorent les propriétés physicochimiques du sol, promeuvent la croissance ainsi que la tolérance des plantes face aux stress biotiques. Ils ont la possibilité de limiter la croissance du pathogène ainsi que de quelques nématodes et insectes par la compétition, par la détoxification ou la dégradation des facteurs de virulence en sécrétant des enzymes hydrolytiques, ou en induisant indirectement une résistance systémique chez la plante (Afzal et al., 2019).

#### **2.3.1. Protection des plantes par les composés antimicrobiens produits par les bactéries endophytes**

##### **2.3.1.1. Les composés antimicrobiens solubles (Production des enzymes lytiques et des antibiotiques)**

Le parasitisme direct représente la capacité d'un micro-organisme antagoniste à s'attaquer aux hyphes des pathogènes fongiques par la production d'enzymes lytiques de la paroi cellulaire. La paroi cellulaire fongique est composée de chaînes de sucres tels que la chitine et le glucane en association avec les protéines de la paroi cellulaire créant chez

l'organisme une résistance mécanique et une intégrité structurale. La chitine est un composé polymère linéaire de sous-unités liées de N-acétylglucosamine tandis que le glucane agit comme un matériel de remplissage et constitue environ 50 à 60% de la paroi cellulaire totale (Spadaro and Droby, 2016). La teneur en chitine dans la paroi cellulaire des champignons filamenteux est supérieure à 20% (Seidl, 2008). La désintégration de la paroi cellulaire fongique par l'action des enzymes hydrolytiques extracellulaires des antagonistes, telles que les chitinases, les chitosanases, les glucanases, la cellulase et / ou la protéase, individuellement ou en combinaison, ont été décrites chez plusieurs agents de lutte biologique (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006 ; Spadaro et Droby, 2016). Essghaier et al. (2009) ont montré que l'effet antagoniste des bactéries halophiles *Bacillus spp.* contre la moisissure grise de *B. cinerea* est corrélé avec la production des enzymes hydrolytiques antifongiques comme la chitinase, la  $\beta$ -1, 3-glucanase, la cellulase et la protéase.

Mise à part la production d'enzymes lytiques, les bactéries endophytes secrètent des antibiotiques (Raaijmakers et Mazzola, 2012) pour le contrôle des agents pathogènes. Le rôle des antibiotiques dans la suppression des maladies a été mis en évidence par l'utilisation des bactéries mutantes non productrices d'antibiotiques qui ont perdu tout ou une partie de leur capacité de prévenir les dommages causés par les phytopathogènes sur les plantes (Sousa et Olivares, 2016 ; Heimpel et Mills 2017) ou dans le cas où il a été possible de purifier les antibiotiques spécifiques des bactéries et de prouver leurs activités anti-microbiennes (Glick 2015). Les bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites à activité antifongique, antibactérien, antiviral et insecticide. Les antibiotiques des *Bacillus*, sont soit dérivés d'une synthèse ribosomique ou non ribosomique et /ou des polycétides synthétases (NRPS / PKS) dont les Tas A, sublancine, subtilosine, bacilysine, chlorotétain, subtiline, bacillaène, surfactine, iturine et fengycine. Kefi et al., 2015 ont montré que les souches endophytes de tomate BL1 (*B. mojavensis*) et BT5 (*B. halotolerans*) produisent la fengycine et la surfactine alors que BR8 (*B. subtilis*) produit de l'iturine et de la surfactine, la souche BF11 (*B. amyloliquefaciens*) sécrète de la bacillomycine D, de la fengycine et de la surfactine. Ces lipopeptides étaient à la base de l'inhibition de la croissance de *B. cinerea*.

Les antibiotiques produits par les *Pseudomonas*, sont par exemple le secocomycins, le 2,4-Diacetyl Phloroglucinol (DAPG), l'acide pseudomonique, l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), les Pyoluteorins, les Pyrrolnitrins, l'OomycinA, les CepaciamideA, les

Viscosinamides, les Butyrolactones, les Zwittermycins A, les Aerugines, les Azomycines, les Rhamnolipides, le Cépafungines, les Kanosamines et les Karaliciens (Goswami et al., 2016).

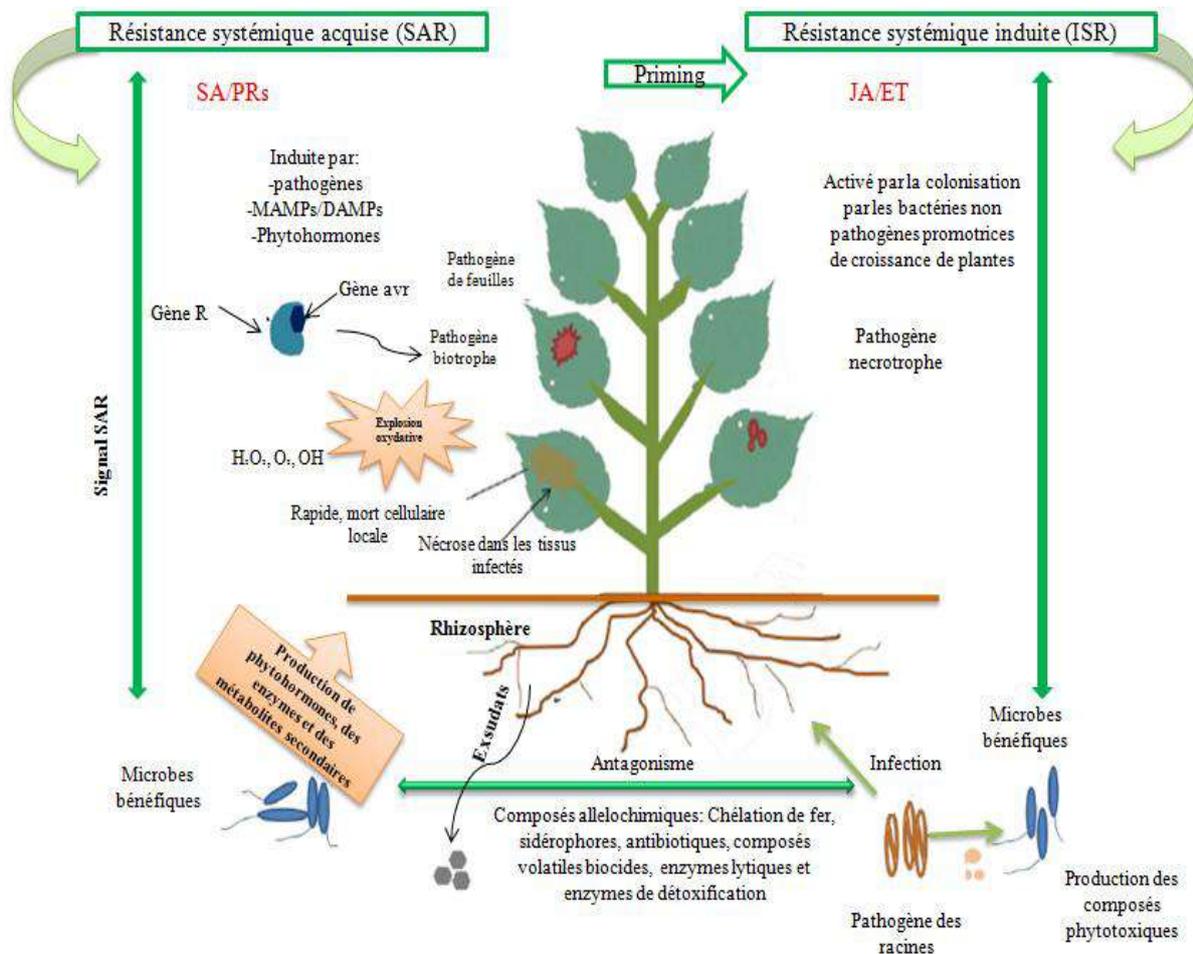
### **2.3.1.2. Protection des plantes par les composés organiques volatils produits par les bactéries endophytes**

En plus des composés antifongiques solubles (enzymes, antibiotiques...), les bactéries endophytes produisent des composés organiques volatils (COVs) qui peuvent agir directement contre l'agent pathogène (antibiose directe) ou indirectement, en induisant une résistance systémique chez leur hôtes (Calvo et al., 2020). Les COVs sont des composés de faible poids moléculaire qui peuvent s'évaporer et se disperser facilement. Ils agissent comme des signaux intraspécifiques et interspécifiques qui sont mobiles dans l'air, l'eau et le sol (Rostás et al., 2015). Chimiquement, ce sont des composés lipophiles (normalement des alcools, des alcanes, des acides ou des cétones), dérivant des voies de biosynthèse de micro-organismes dans le cadre de leur métabolisme primaire et secondaire (Gotor-Vila et al., 2017a). Ils sont utilisés à des fins différentes comme l'augmentation de la productivité dans l'agriculture ou la protection des végétaux contre les maladies fongiques (Kai et al., 2007). Plusieurs groupes bactériens produisent les COVs. De nombreux agents bactériens appartiennent au genre *Streptomyces* ou *Pseudomonas* (Di Francesco et al., 2016; Mari et al., 2016). Les COV produits par *Bacillus* spp. sont parmi les mieux connus pour leur activité antifongique. Les COVs produits par *B. thuringiensis* et *B. pumilus* ont réduit d'environ 88,5% des infections causées par l'antracnose chez les mangues (Zheng et al., 2013). De même, les COV de *B. subtilis* ont réduit la croissance de *P. digitatum* de 30 à 70% pendant les essais *in vitro* (Leelasuphakul et al., 2008). Arrebola et al. (2010) ont évalué les COV produits par *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* pour l'activité antifongique contre le pathogène d'agrumes *Penicillium*.

### **2.3.1.3. Protection des plantes par l'induction de la résistance systémique chez les plantes**

La résistance systémique induite (ISR) chez les plantes par les microorganismes est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise (SAR) qui induit une réponse immunitaire, puissante et généralisée à la plante entière. La SAR se développe lorsque les plantes activent avec succès leur mécanisme de défense en réponse à une infection primaire par un agent pathogène (Ryan et al., 2008) et induit une réaction d'hypersensibilité, tandis que dans le cas de l'ISR, la bactérie inductrice ne provoque pas de symptômes visibles sur la plante hôte (Van Loon et al., 1998). Les endophytes peuvent protéger les plantes par l'induction de la résistance systémique chez la plante (ISR) (Bordiec et al., 2011). Les

composants bactériens induisant ce mécanisme dans la plante sont les flagelles, les lipopolysaccharides, les sidérophores, les lipopetides et les composés organiques volatils (Bordiec et al. 2011). Le déclenchement de l'ISR par les bactéries endophytes entraîne le renforcement de la paroi cellulaire végétale et la modulation de la physiologie et des réponses métaboliques de l'hôte (Dalal and Kulkarni, 2015). Il a été démontré que de nombreuses bactéries endophytes induisent l'ISR par la régulation de la voie de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique (JA) ainsi que de l'éthylène (ET) (Miliute et al. 2015) (Figure 10). Une fois que les gènes de défense sont exprimés, l'ISR active de multiples mécanismes de défense potentiels qui incluent l'activité accrue des chitinases, des  $\beta$ -1,3-glucanases, des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase (GP), la catalase (CAT) et les peroxydases (POS) (Gechev et al., 2006).



**Figure 10.** Diagramme schématisique montrant deux types différents de résistance systémique chez les plantes. La résistance systémique acquise (SAR) dépendante de l'AS est activée lors d'une attaque d'agents pathogènes, de traitements foliaires de plantes présentant des modèles moléculaires associés à des microbes ou à des dommages (MAMP, DAMP), des phytohormones ou certains xénobiotiques (par exemple, certains pesticides). La résistance systémique induite (ISR) indépendante de l'SA est principalement dirigée par l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Les SAR et les ISR sont tous deux cruciaux dans les plantes pour se défendre contre les stress biotiques et abiotiques (Syed Ab Rahman et al., 2018).

### **3. Utilisation des bactéries endophytes pour la lutte biologique contre quelques agents pathogènes de la tomate et de la luzerne annuelle**

#### **3.1. Lutte biologique contre la pourriture grise chez la tomate**

##### **3.1.1. Impact économique, taxonomie, symptômes, spectre d'hôtes et cycle de vie de *Botrytis cinerea***

La moisissure grise, causée par *B. cinerea*, a un impact économique désastreux sur de nombreuses cultures partout dans le monde, bien qu'il ne soit pas facile à estimer en raison de la large gamme de cultures hôtes. Son impact économique concerne principalement le vin et le raisin de table, les solanacées (tomate, poivron, aubergine), les cucurbitacées, la fraise, la laitue et autres légumes, les haricots, et les plantes ornementales. L'agent pathogène provoque à la fois des pertes qualitatives (goût, arôme, casse oxydasique dans le vin) et quantitatives (rendements réduits de fruits, de légumes et de plantes d'ornement). Les pertes dues à la pourriture des fruits peuvent dépasser 50%. Les fongicides sont généralement appliqués une fois par semaine et leur coût représente environ 7% des coûts variables avant la récolte (environ 690 \$ par acre). Le coût global de la protection des cultures contre l'agent pathogène a récemment été estimé à environ 310 millions de dollars, principalement en France et en Italie pour la vigne et en Chine et au Japon pour les légumes, mais aussi en Espagne, au Chili, aux États-Unis, en Allemagne, en Australie et aux Pays-Bas. Pour ses impacts scientifiques et économiques, *B. cinerea* est considéré comme le deuxième agent pathogène fongique, après *Magnaporthe oryzae*, le plus important en pathologie moléculaire des plantes et constitue un excellent modèle pour l'étude du processus d'infection chez les agents pathogènes nécrotrophes (Dean et al., 2012).

*B. cinerea* est un agent pathogène nécrotrophe appartenant la classe des Léotiomycètes, à l'ordre des Helotiales, à la famille des Sclerotiniaceae et au genre *Botrytis*. Un double système de nomenclature fongique a été proposé en 1905, recommandant à la fois des noms de la forme asexuée et celle sexuelle pour le champignon. En ce sens, *B. cinerea* est le nom du stade asexué (anamorphe) et *Botryotinia fuckeliana* est le nom du stade sexuel (téléomorphe) (Faretra et al., 1988). Le genre *Botrytis* comprend environ 28 espèces bien décrites (Beever et Weeds 2004). La plupart des espèces, à l'exception de *B. cinerea*, ont une gamme d'hôtes limitée n'attaquant que quelques espèces de plantes monocotylédones ou de dicotylédones tandis que certaines espèces comme *Botrytis galanthina*, semblent être spécifiques à l'hôte (Beever et Weeds 2004). L'espèce *B. cinerea* est la plus l'espèce la plus redoutable causant

des pertes considérables dans les cultures, notamment chez la vigne et la tomate (Droby et Lichter 2004).

En 1977, Jarvis a rapporté que *B.cinerea* infectait plus de 200 espèces de plantes ; en 2015, plus de 1 400 espèces appartenant à 586 genres ont été rapportés par Fillinger et Elad comme hôtes pour *B. cinerea*. La majorité d'entre elles appartient à la division des plantes à graines (Spermatophyta), 15 à la division des plantes sans fleurs (Pteridophyta) et seulement 1 à la Lycopodiophyta. Aucun membre de la division de Bryophyta n'a été signalé comme hôte de *B. cinerea* dans la nature, bien que le champignon puisse produire des symptômes sur *Physcomitrella patens* après une inoculation artificielle dans des conditions de laboratoire (De León et al., 2007). Les plantes hôtes de Botrytis comprennent des espèces qui poussent dans une variété de régions climatiques allant des tropiques aux régions froides, dans les endroits humides aussi bien que secs, dans les champs ouverts, dans les serres, dans les environnements fermés et même pendant le stockage au froid. Les plantes hôtes affectées par *Botrytis spp.* sont originaires de la plupart des continents, c'est-à-dire les Amériques, l'Afrique, l'Europe, l'Asie, l'Australie et diverses îles (Fillinger and Elad, 2015).

Un pathosystème modèle pour étudier les interactions entre l'hôte et le pathogène est le système tomate– *B. cinerea*, où l'agent pathogène provoque une perte de récolte en raison d'une infection avant et après récolte (Dean et al., 2012; Romanazzi et Droby, 2016).

La plupart des espèces et des isolats de *Botrytis* produisent de nombreuses conidies (macroconidies) qui sont des conidies asexuées portées à l'extrémité des conidiophores ramifiés (figure 7). La taille des conidies varie selon l'espèce (Beever et Weeds 2004). En général, les conidies ont une courte durée de vie en fonction de la température, de l'humidité et de l'exposition au soleil (Nassr et Bakarat 2013). En hiver, des espèces de Botrytis produisent des corps de repos mélanisés, appelés les sclérotés, qui résistent aux conditions environnementales défavorables. Certaines espèces, notamment *B. cinerea*, produisent des sclérotés assez gros (~ 4 µm), tandis que d'autres par exemple *B. tulipae* sont assez petits (~ 0,8 µm). Dans des conditions favorables, pendant des périodes humides au printemps, les sclérotés germent pour produire des mycéliums et des conidies. Les sclérotés sont à l'origine d'infections précoces au début de la saison de croissance des plantes hôtes (Hsiang et Chastagner 1992). *Botrytis spp.* peut également produire des structures de repos temporaires appelées chlamydospores qui ont des parois épaissies et hyalines. Ces structures peuvent survivre à des périodes de sécheresse pouvant aller jusqu'à 3 mois (Urbasch 1983). On les trouve souvent dans les cultures vieillissantes au sein des hyphes ou aux extrémités des

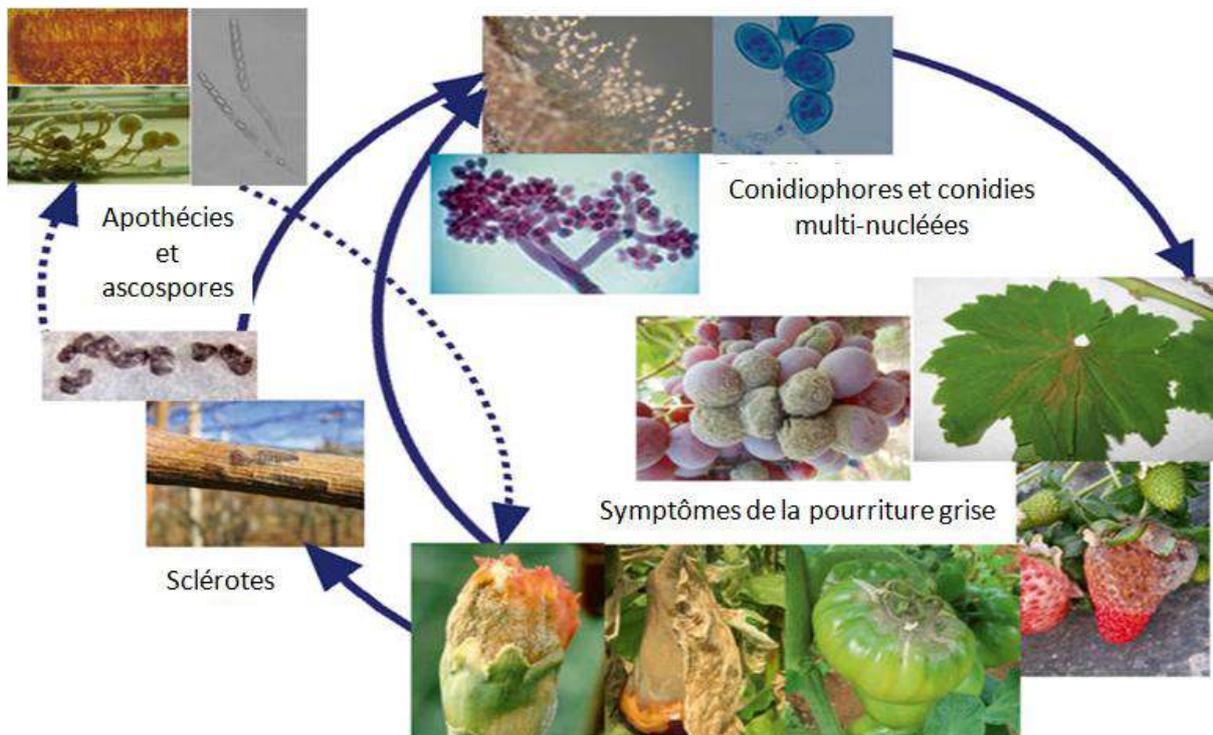
hyphes. Dans des conditions favorables, ils germent pour produire des hyphes ou des microconidies (Figure 11). Les gouttelettes d'eau peuvent disperser les conidies, mais ce n'est probablement pas une méthode de dispersion majeure (Jarvis, 1962). La formation de conidies est stimulée par des longueurs d'onde spécifiques de la lumière (Epton et Richmond, 1980) et proches des UV. Cependant, certains isolats peuvent sporuler dans l'obscurité. Les conidies peuvent être transportées par les courants d'air vers les cultures voisines. *B. cinerea* montre une flexibilité remarquable dans son adaptation à différents environnements pour germer et obtenir des nutriments à partir d'une plante hôte.

Jusqu'aux années 1980, la plupart des études sur la germination et la pénétration initiale utilisaient des suspensions conidiennes, mais les inoculations sèches ont ensuite été examinées en détail par Salinas et al. (1989), Williamson et al. (1995), et Coertze et al. (2001). On a découvert que les conidies inoculées à sec produisaient un ou deux (parfois jusqu'à cinq) tubes germinatifs courts et aucun appressorium terminal évident avant d'effectuer l'entrée dans une cuticule hôte intacte sur les feuilles, les pétales ou les fruits. Si le champignon se développe fortement à partir d'une «base saprophytique» (pétale mort adhérent, «tas de déchets» dans les raisins, les grains de pollen), il peut former des coussins d'infection en forme de dôme sur l'hôte (Backhouse et Willets, 1987; Jarvis, 1980). Chez les petits fruits, les organes floraux sont des sites importants d'infection primaire, mais l'agent pathogène peut alors rester inactif pendant une période considérable avant de détruire rapidement les tissus à maturité du fruit. Dans les raisins, il existe de fortes preuves histologiques (Viret et al., 2010) que les conidies infectent principalement le réceptacle des fleurs, et dans une moindre mesure le stigmate et les styles, et l'agent pathogène est alors maintenu à l'état de repos par les défenses de l'hôte. Les fissures microscopiques dans la cuticule jouent également un rôle dans les infections ultérieures, surtout si les baies sont gonflées après la pluie (Williamson et al., 2007).

L'humidité relative (HR) est un facteur environnemental qui joue un rôle crucial pour l'infection par *B. cinerea*, mais l'HR est extrêmement difficile à réguler expérimentalement (Harrison et al., 1994). Des valeurs d'humidité relative supérieures à 93% sont nécessaires pour la germination des conidies et l'infection des pétales de rose en l'absence de gouttelettes d'eau (Williamson et al., 1995). La persistance d'une HR élevée pendant les périodes de floraison conduit à des cycles successifs d'infection et de sporulation, ne laissant aucune possibilité d'élimination rapide des fruits en cours de maturation et des épidémies dommageables peuvent en résulter sans mesures de contrôle adéquates. Le rôle des insectes

vecteurs de *B. cinerea* n'a été reconnu qu'au cours des 20 dernières années. Dans les raisins, plusieurs insectes sont connus pour disperser des conidies viables, soit sur leurs appendices externes, soit même à l'intérieur de l'intestin, pour déposer un inoculum à la surface des fruits (Engelbrecht, 2002). Bien que *B. cinerea* ne soit pas considéré principalement comme un pathogène des plaies, il peut infecter les plaies et, lorsque les insectes causent des dommages, il peut prospérer, comme dans les framboises infestées par des larves de framboisier (*Byturus tomentosus*) (Woodford et al., 2002).

La maladie la plus courante causée par *Botrytis* est probablement la pourriture des fruits ou la moisissure grise des raisins, des baies, des fruits et des tomates. Cependant, *Botrytis spp.* cause également les brûlures des fleurs, les chancres de la tige, les taches foliaires, la fonte des semis et la pourriture des tubercules, et des racines. Des exemples de telles maladies sont la moisissure grise de la fraise, la pourriture des grappes des raisins et la brûlure des feuilles de l'oignon. Une fois que *Botrytis spp.* se manifeste sur les fruits, les baies, les légumes et les fleurs récoltés, il peut provoquer une pourriture molle secondaire pendant le stockage ou le transit ou même sur le marché. Des maladies d'amortissement peuvent survenir sur les semis cultivés dans des chambres froides, mais sont également possibles sur le terrain lorsque les graines sont contaminées par les sclérotés de *Botrytis* (Fillinger and Elad, 2015).



**Figure 11.** Cycle de vie de *Botrytis cinerea* et symptômes associés (Fillinger and Elad, 2015).

### 3.1.2. Biocontrôle de *Botrytis cinerea*

Les fongicides sont toujours la méthode la plus couramment utilisée pour lutter contre la moisissure grise. Bien qu'il existe de nombreux fongicides pour lutter contre *B. cinerea*, leur utilisation n'est pas considérée comme durable en raison de leurs effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement. De plus, leurs applications fréquentes augmentent le risque de développement des souches résistantes chez le champignon (Haidar et al., 2016; Zhao et al., 2018). Par conséquent, le développement de méthodes complémentaires à la lutte chimique, telles que l'utilisation de micro-organismes comme agents de lutte biologique (dont les bactéries endophytes), sont de plus en plus considérés comme des alternatives prometteuses pour l'agriculture mondiale (Haidar et al. 2016). Plusieurs études ont été menées pour évaluer le potentiel des bactéries endophytes pour le contrôle biologique de *B. cinerea*. Ces bactéries ont été isolées de différentes espèces végétales conduisant à l'identification de plusieurs micro-organismes pouvant inhiber la croissance de ce champignon *via* la production des antibiotiques comme les lipopeptides (Kefi et al. 2015), par la sécrétion des composés volatils organiques (Boukaew et al., 2017 ; Gotor-Vila et al., 2017 ; Gao et al., 2018 ; Jiang et al., 2018 ; Bouaoud et al., 2018) et par les enzymes hydrolytiques (Essghaier et al. 2009). Wang et al. (2009) ont montré que la souche bactérienne endophyte *B. subtilis* EB-28 isolée de tomate pouvait être utilisée comme agent de lutte biologique contre *B. cinerea* attaquant la tomate dans les conditions de terrain et après récolte. L'effet antagoniste du filtrat de fermentation de la souche bactérienne endophyte de tomate *Brevibacillus brevis* W4 sur *B. cinerea* a été évalué par Yang et al. (2011) qui ont montré que les caractéristiques de stabilité de cet antagoniste (sous variation de température, du pH et de l'UV) sont propices à une future application dans le domaine du biocontrôle. Kefi et al. (2015) ont montré l'effet inhibiteur des lipopeptides sécrétés par les bactéries endophytes de tomate *B. mojavensis*, *B. halotolerans*, *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* contre l'infection sous serre des plantes de tomates par *B. cinerea*.

Sur la base de ces études plusieurs biopesticides à base de bactéries ont été développés contre la pourriture grise. Double Nickel 55WDG/LC™ (*Bacillus amyloliquefaciens*) et Serenade® Max (*B. subtilis* QST 713) sont deux biofongicides dont le principe actif repose sur la capacité antimicrobienne des souches bactériennes qui les constituent. Companion (*B. subtilis* GB03) agit par l'antibiose et l'induction de la résistance systémique chez la plante et Bio Arc (*B. megaterium*) agit par l'activité enzymatique (Bolívar-Anillo et al., 2019).

### **3.2. Lutte biologique contre la maladie de la tige noire chez la luzerne**

#### **3.2.1. Taxonomie, cycle de vie et de dispersion du *Phoma medicaginis***

L'espèce fongique *P. medicaginis* Malbr et Roum,(1886) (nouvellement définie sous le nom d'*Ascochyta medicaginicola* var. *medicaginicola* par Chen et al.(2015))appartient à la classe des Dothideomycètes, à la sous classe des Pleosporomycetidées, à l'ordre des Pleosporales, au sous ordre des Pleosporinées, à la famille des Didymellacées et au genre *Ascochyta* (Chen et al., 2015).

La plupart des conidies sont non septées mais il est possible d'en trouver qui sont cloisonnées. Les tailles de conidies varient de 4,9 à 7,1 µm de longueur et de 2,0 à 2,9 µm de largeur (Djébali, 2013). Le cycle biologique de *Phoma* est influencé par la niche écologique qu'il occupe. L'infection primaire des hôtes peut se produire par les blessures qui sont causées par des pratiques culturales, les conditions du climat, ou par des attaques d'autres organismes (Figure 12). L'entrée dans la plante hôte par l'intermédiaire des stomates ou directement à travers l'épiderme est aussi possible. Initialement, l'hyphe fongique se développe d'une façon intercellulaire dans les tissus de la plante. Après ce stade asymptomatique, le champignon devient nécrotrophe et ainsi le champignon a accès aux ressources du tissu végétal mort ce qui se traduit par l'apparition des nécroses au niveau des tissus de la plante (Aveskamp *et al.*, 2008).Ces lésions s'étendent et les feuilles infectées subissent une chlorose et une défoliation, alors que les lésions de la tige et le pétiole peuvent progresser entraînant la pourriture du collet (Figure 13). Une fois que *P. medicaginis* est installé, il produit une toxine appelée BréfeldineA dans les tissus morts déjà colonisés. Celle-ci inhibe la croissance des champignons saprophytes concurrents (Kamphuis *et al.*, 2007). Les conidies se dispersent facilement par des projections d'eau, ou par le vent et peuvent ainsi infecter de nouvelles plantes hôtes. En absence d'un hôte approprié, en raison de la rotation des cultures par exemple, ce champignon persiste sur les débris des plantes au sol et peut surmonter les conditions de stress extrêmes comme la sécheresse et le froid sous la forme des chlamydospores uni-ou pluricellulaires. Parfois un cycle méiotique peut être observé, en plus de celui asexuée décrit précédemment, dans lequel les ascospores sont formées dans l'asque pseudothelial. Mais ce stade sexuel est rare (Aveskamp *et al.*, 2008). *Phoma medicaginis* peut attaquer aussi les racines et les nodules des plantes de genre *Medicago* sur lesquelles il peut accomplir son cycle de développement et engendrer une réduction importante de la croissance des plantes infectées (Djébali, 2013) et leur capacité de fixation d'azote atmosphérique (Chihaoui et al., 2014) (Figure 12).

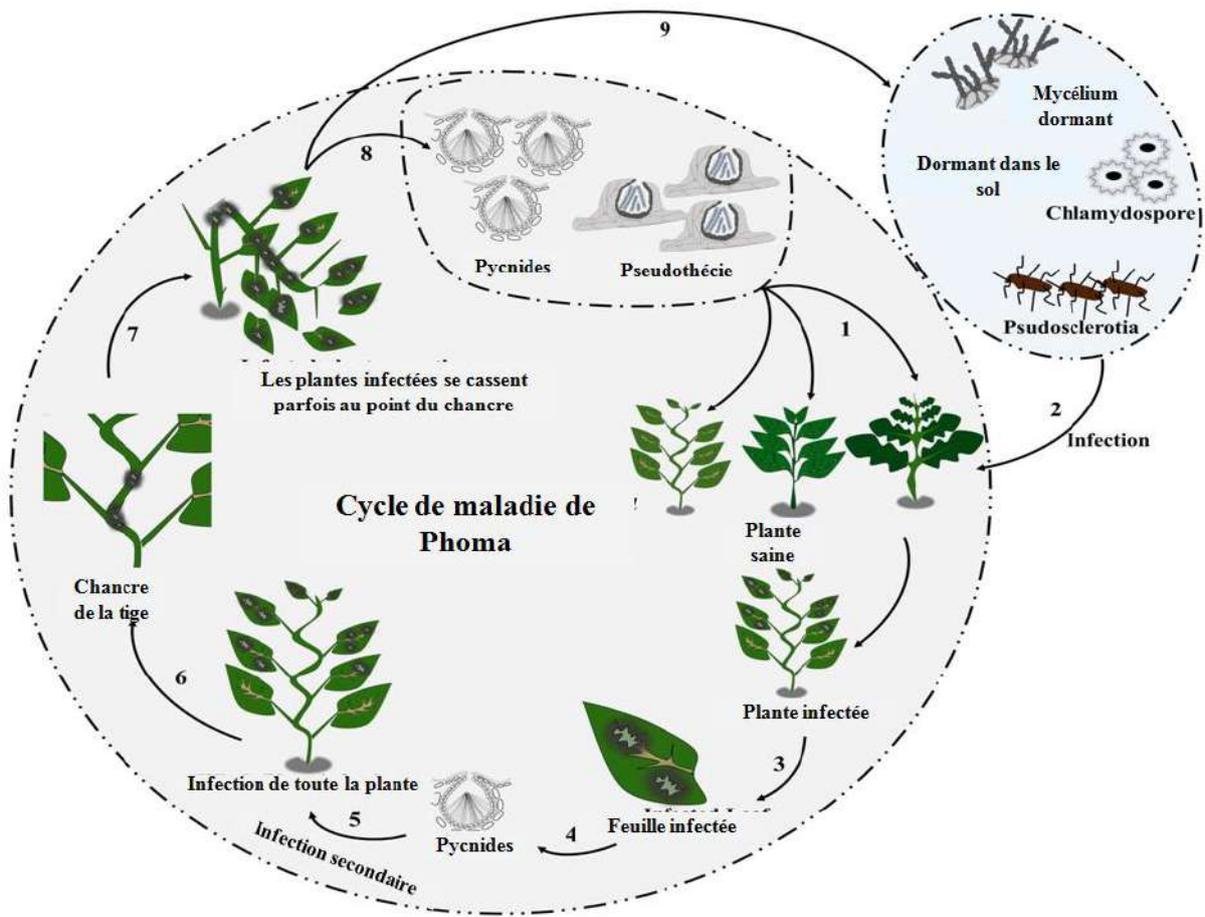
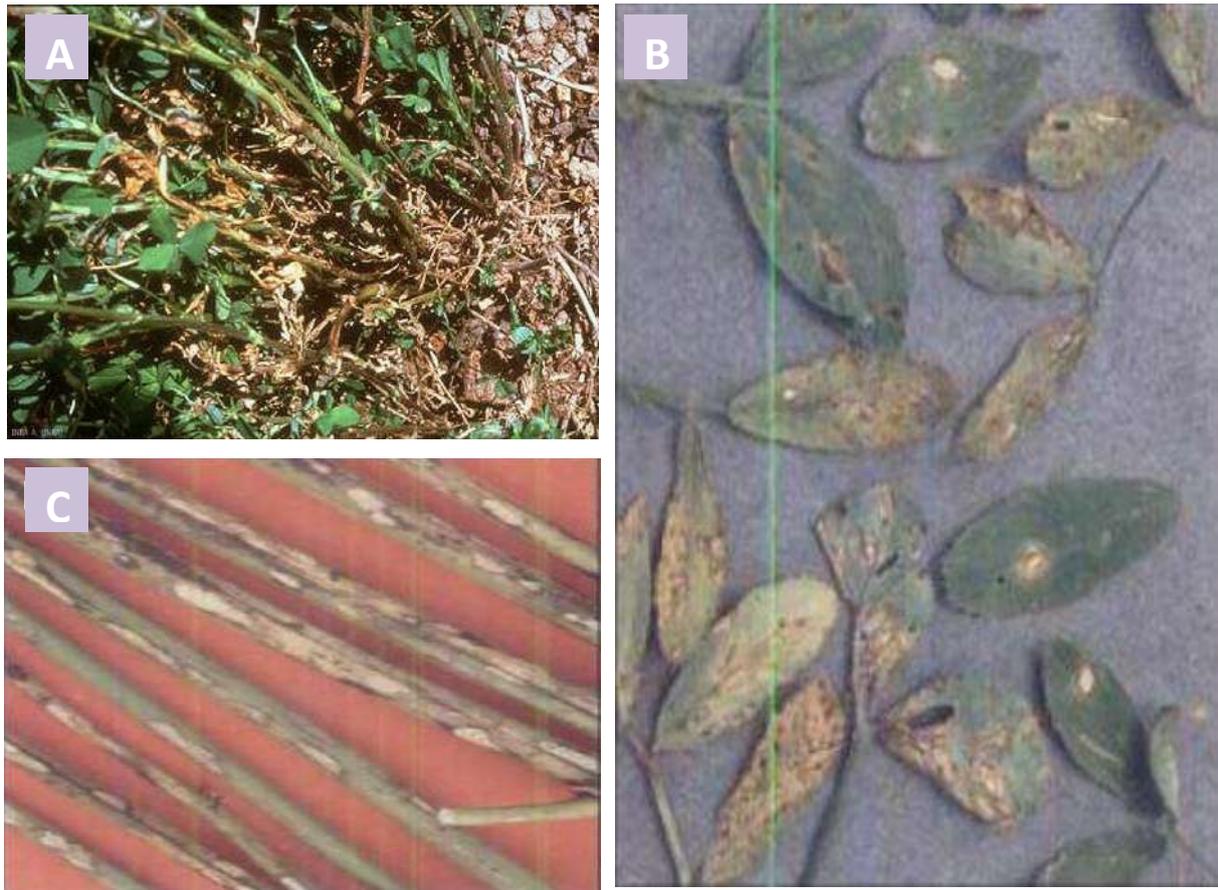


Figure 12. Cycle de vie de *Phoma* sur les plantes hôtes (Deb et al., 2020)



**Figure 13.** Symptômes de la maladie de la tige noire causée par *P. medicaginis* sur les luzernes (A), symptômes sur les feuilles (B) et sur les tiges (C) (<https://www.agrifind.fr/alertes/luzerne/luzerne-phoma/>)

### 3.2.2. Interaction *Medicago truncatula* – *Phoma medicaginis*

Le pathosystème *M. truncatula* – *P. medicaginis* a été l'objet de plusieurs études portant sur différents sujets dont le plus important est la caractérisation des processus d'infection et des mécanismes de résistance de *M. truncatula* à cet agent pathogène afin de trouver des solutions de lutte contre cet agent pathogène redoutable et de les appliquer aux autres espèces potentiellement infectées par ce champignon. Parmi ces études, on peut citer celle faite par Angevain (1983) qui a présenté une nouvelle méthode pour la sélection des cultivars de luzerne résistants à l'infection artificielle par *P. medicaginis*. O'Neill *et al.* (2003) ont testé la sensibilité d'une collection de 36 espèces annuelles de *Medicago spp.* à *P. medicaginis*. En 2006, Ellwood *et al.* ont cherché à distinguer les différents génotypes de *P. medicaginis* isolés à partir de *M. truncatula* pour décortiquer les sources de résistance à ce pathogène en examinant l'interaction entre *P. medicaginis* et un génotype résistants de *M. truncatula*. Dhulipala (2007) a utilisé *P. medicaginis* comme un pathosystème modèle pour *M. truncatula*

en créant différents mutants pour caractériser génétiquement sa pathogénicité et son mode d'interaction avec cette légumineuse. Kamphuis *et al.* (2008) ont utilisé *M. truncatula* comme support pour une étude génétique et cytologique de la résistance contre *P. medicaginis*. Ce pathosystème offre aussi l'avantage d'étudier l'infection à la fois sur les feuilles et sur les racines donnant la possibilité de comparer les mécanismes et les gènes de résistance de *M. truncatula* à *P. medicaginis* dans ces deux organes. A cet égard, Djébali (2013) n'a pas trouvé de corrélation entre le pourcentage d'infection sur les feuilles et les racines de 14 souches de *P. medicaginis* suggérant probablement des mécanismes de défense différents entre ces deux organes.

### **3.2.3. Biocontrôle de *Phoma medicaginis***

Mise à part le contrôle en utilisant les fongicides conventionnels dont les effets néfastes ont déjà été énumérés, la lutte contre *P. medicaginis* a été orientée vers l'étude de la résistance génétique chez *M. sativa* et *M. truncatula*. Ces études ont montré que la résistance est multigénique et il n'existe pas vraiment une source de résistance adéquate pour développer des lignées résistantes. De ce fait le biocontrôle de *P. medicaginis* se présente comme alternative intéressante. Cependant, peu de données sont disponibles sur le biocontrôle du *P. medicaginis* infectant les légumineuses et surtout du genre *Medicago*. Mrabet *et al.* (2011) ont montré que parmi 17 souches de *S. meliloti* isolées à partir de nodules racinaires de *M. truncatula* et *M. laciniata* cultivées dans des sols tunisiens, six ont montré jusqu'à 60% d'inhibition de la croissance de cinq souches de *P. medicaginis*. Dans une autre étude, il a été montré que l'incidence de *P. medicaginis* sur la luzerne a été réduite par les champignons mycorhiziens à arbuscules *Rhizophagus intraradices* qui augmentent la croissance de la luzerne et induisent l'accumulation de molécules impliquées dans la défense des plantes (Y. Li *et al.*, 2019).

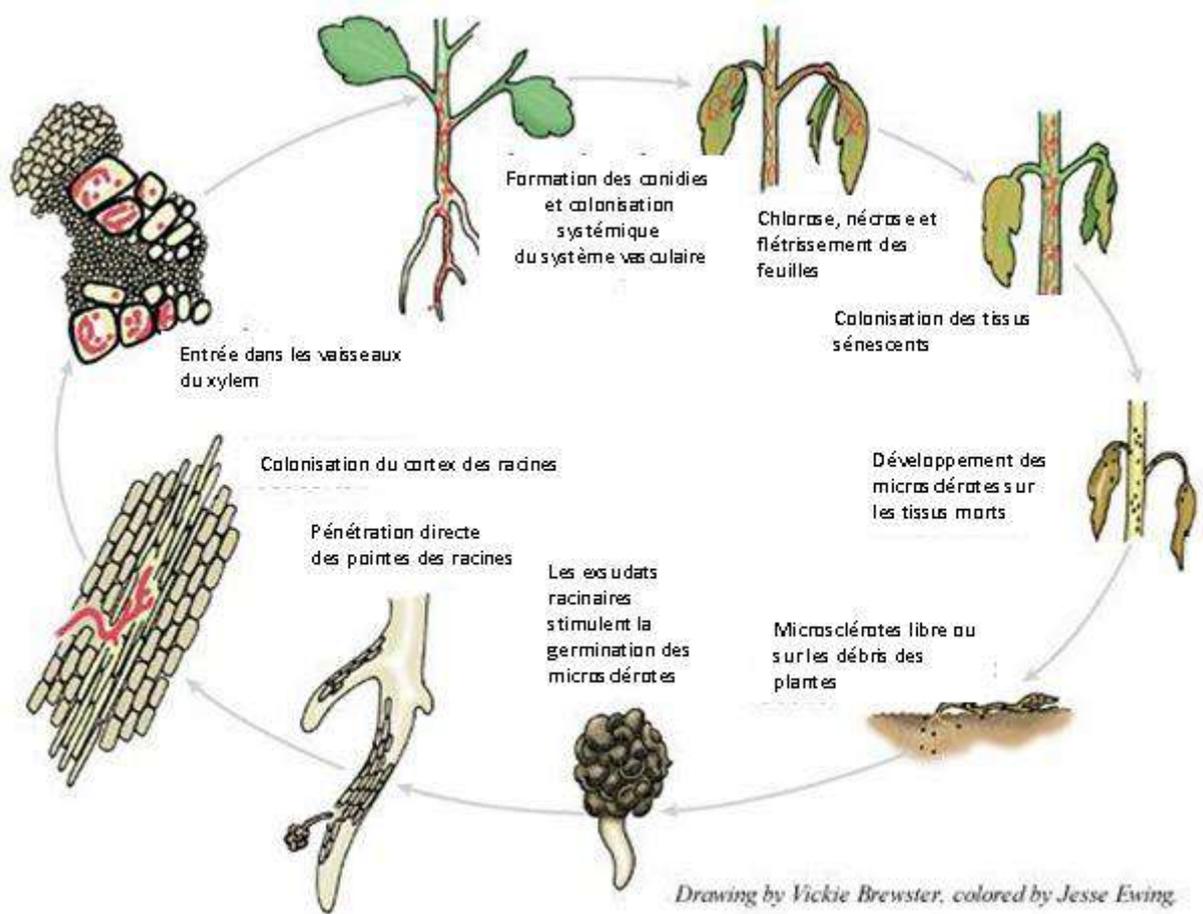
## **3.3. Lutte biologique contre la verticilliose chez la luzerne**

### **3.3.1. Taxonomie, spectre d'hôte, cycle de vie et mode de dispersion de *Verticillium alfalfae***

*Verticillium* attaque plus de 200 espèces de plantes partout dans le monde. Cependant, il n'est pas possible de compiler de manière claire le spectre d'hôtes pour chaque espèce de *Verticillium* à partir de la littérature (Walker 1990; Inderbitzin and Subbarao, 2014), en raison des appellations incohérentes des espèces de *Verticillium* en raison de désaccords taxonomiques passés (Hawksworth et Talboys 1970), et du manque de fiabilité inhérent d'identification des espèces sur la base de caractères morphologiques (Inderbitzin et Subbarao

2014). *Verticillium alfalfae* n'a jusqu'à présent été isolé qu'à partir de *Medicago sativa* (luzerne) (Inderbitzin and Subbarao, 2014).

La verticilliose est favorisée par les sols humides et des températures allant de 21 à 27 °C à travers la germination des microsclérotés en présence des exsudats racinaires des plantes. Les hyphes des conidies pénètrent à travers la région d'élongation et le cortex puis envahissent les vaisseaux du xylème où se forment les conidies qui assurent l'envahissement de la plante. En raison des tissus fongiques et des produits de réaction de l'hôte, le système vasculaire se bouche, empêchant l'eau d'atteindre les parties supérieures de la plante (Figure 14). Les feuilles et les tiges privées d'eau présentent des symptômes de flétrissement et de chlorose foliaire. Au fur et à mesure de la mort de la plante malade, le champignon produit des microsclérotés qui sont libérés dans le sol avec la décomposition de la matière végétale. Le champignon survit pendant de nombreuses années sous cette forme dormante ou sous forme de mycélium ou de conidies dans le système vasculaire des plantes vivaces. Chez certains hôtes, le flétrissement verticillien se développe principalement à la levée des plantes, qui meurent généralement peu de temps après l'infection. Les infections tardives sont plus courantes, ce qui fait que les feuilles supérieures tombent et que d'autres feuilles développent des plaques chlorotiques irrégulières qui deviennent nécrotiques. Les plantes âgées infectées par *Verticillium* sont généralement rabougries et leurs tissus vasculaires présentent une coloration brunâtre caractéristique. L'infection par *Verticillium* peut entraîner une défoliation, un flétrissement progressif et la mort des branches successives, ou un effondrement brutal et la mort de la plante entière (Agrios, 2005) (Figure 15).



**Figure 14.** Cycle de vie de *Verticillium* chez les plantes hôtes (<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/VerticilliumWilt.aspx>)



**Figure 15.** Symptômes de la verticilliose : (A) Les plantes infectées peuvent avoir un mélange de branches saines et malades. Cela est dû au fait que le pathogène peut initialement infecter une partie, mais pas la totalité, du tissu vasculaire de la plante. (B) Les folioles sur les branches infectées présentent initialement un jaunissement en forme de V ([https://webhosting.cals.wisc.edu/wpcontent/blogs.dir/39/files/IPM Scout School Talk/img10.php](https://webhosting.cals.wisc.edu/wpcontent/blogs.dir/39/files/IPM_Scout_School_Talk/img10.php))

### 3.3.2. Interaction *Medicago truncatula* – *Verticillium alfalfae*

Le pathosystème *M. truncatula* – *V. alfalfae* a été l'objet de plusieurs études portant sur différents sujets dont le plus important est des études de la résistance génétique à ce champignon. Dans une étude faite par Negahi et al. (2013), ayant comme objectif d'étudier le contrôle génétique et biodiversité de la tolérance à *V.alfalfae* chez *M. truncatula*, une forte variabilité génétique des réponses à *V.alfalfae* parmi les génotypes de *M. truncatula* et une interaction significative entre la plante hôte et les isolats pathogènes. Les auteurs ont aussi prouvé que *M. truncatula* est une légumineuse modèle importante qui a facilité les progrès dans la compréhension des symbioses des légumineuses et ouvert de nouveaux domaines de recherche sur le stress biotique, les réponses des plantes aux agents pathogènes comme *V.alfalafa* et le développement des plantes. Une étude faite par Ben et al. (2013) ayant pour but d'étudier la diversité naturelle de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* a permis d'identifier des mécanismes génétiques distincts conférant une résistance partielle à *V.*

*alfalfae*. Ils ont prouvé que plusieurs mutants, affectés à différentes étapes du processus de nodulation, présentent une réponse modifiée à la verticilliose, ainsi les résultats soulignent l'existence de croisements entre les voies de signalisation dans la symbiose et la maladie, et la nécessité d'études détaillées du *V. alfalfae* et d'autres agents pathogènes des racines chez *M.truncatula*. Une étude faite par Toueni et al. (2016) ayant pour objectif d'étudier la résistance quantitative à *V. alfalfae* chez *M. truncatula* ont prouvé que cette résistance quantitative impliquant l'éradication du champignon des racines est associée à des réponses transcriptionnelles liées à l'immunité innée de la plante.

### **3.3.3. Biocontrôle de *Verticillium***

La lutte contre la maladie de flétrissement causée par *Verticillium* est difficile en raison de la longue persistance des structures de repos dans le sol et de leur large gamme d'hôtes. De plus, l'agent pathogène est difficile à gérer une fois qu'il atteint le tissu vasculaire de la plante et les fongicides sont peu efficaces. La réduction de l'inoculum primaire dans le sol a été considérée comme un élément essentiel pour réussir la lutte contre la verticilliose. Les fumigants chimiques peuvent réduire l'inoculum du *Verticillium* dans le sol, mais leur utilisation est restreinte en raison des effets néfastes sur l'environnement. Parmi les approches les plus efficaces contre *Verticillium* est l'identification des cultivars résistants (Deketelaere et al., 2017). Ainsi, le pathosystème *Medicago truncatula-Verticillium alfalfae* a été utilisé pour des études de la résistance génétiques à ce champignon (Ben et al., 2013 ; Negahi et al., 2013, 2014 ; Toueni et al., 2016). Par ailleurs, les méthodes de lutte biologique se sont avérées efficaces contre plusieurs espèces du *Verticillium* chez différentes plantes. Ainsi, quelques études ont été menées pour étudier les activités de lutte biologique des endophytes bactériens contre les maladies du flétrissement causées par *Verticillium*. La souche bactérienne endophyte des oliviers *Pseudomonas fluorescens PICF7* a considérablement retardé l'apparition des symptômes et réduit l'incidence et la gravité du flétrissement verticillien de 82% et 96%, respectivement (Mercado-Blanco et al., 2004). Une souche bactérienne *Paenibacillus K165* a été isolée des extrémités des racines de tomate par Tjamos et al. (2004) et a réduit la sévérité de la maladie et le développement des symptômes causés par *V. dahliae* chez la pomme de terre et l'aubergine dans des expériences en serre et sur le terrain. Erdogan and Benlioglu, (2010) ont isolé quatre souches de *Pseudomonas* FP22, FP23, FP30 et FP35 à partir des racines de *Xanthium strumarium*, *Portulaca sp.*, *Gossypium hirsutum* et *Convolvulus arvensis*, respectivement, et les ont testées pour leur impact sur le flétrissement verticillien et les paramètres de croissance chez coton. Cette étude a montré que la réduction de la sévérité

de la maladie par la bactérisation des semences avec ces souches par rapport au témoin non bactérien a été observée (de 39,2% à 50,9% dans les essais de 2005 et de 22,1% à 36,8% dans les essais de 2006). A notre connaissance, il n'ya pas d'études liées à l'utilisation des endophytes pour la lutte biologique contre la verticilliose chez les légumineuses et plus particulièrement les *Medicago*.

#### 4. Objectifs de l'étude

La surexploitation des pesticides chimiques provoque différents effets négatifs sur la santé humaine et l'environnement. L'agronomie mondiale s'oriente vers des solutions innovantes écologiquement compatibles comme l'utilisation des microorganismes bénéfiques. Dans ce contexte, cette étude vise à étudier l'implication des bactéries endophytes dans la lutte biologique contre les phytopathogènes.

Dans le premier chapitre de cette étude, on a pour objectifs de rechercher et de caractériser les bactéries endophytes associées à une espèce végétale cultivée, la tomate (*Solanum lycopersicum*) en se basant sur :

- 1) L'étude de l'effet antagoniste des composés organiques volatiles (COVs) des souches bactériennes endophytes contre *Botrytis cinerea* et leur effet promoteur de croissance des plantules de tomate.
- 2) La caractérisation des COVs des souches bactériennes sélectionnées.
- 3) Etude de l'effet bioprotecteur des bactéries endophytes et leur COVs sur les fruits de tomates infectés par *Botrytis cinerea*.

Dans le deuxième chapitre, on a pour objectifs de rechercher les bactéries endophytes associée à une espèce végétale espèce sauvage, la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) et la reconstitution des microbiotes (consortia) des plantes. La caractérisation des microbiotes est basée sur :

- 1) L'étude des effets antagonistes des consortia bactériens et leurs filtrats contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae* in vitro
- 2) L'étude de l'effet bioprotecteur du consortium sélectionné sur les plantes de *M.truncatula* infectées par *P.medicaginis* ou *V.alfalfae*.
- 3) L'étude des gènes impliqués dans la résistance des plantes de *M.truncatula* prétraitées par le consortium bactérien et infectées par *P.medicaginis*



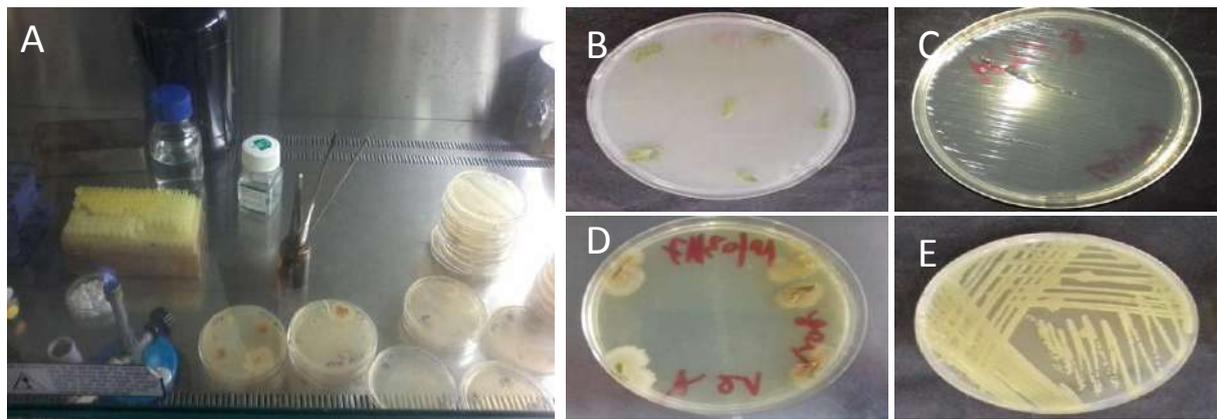
*Matériels et  
Méthodes*

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Souches bactériennes

#### 1.1.1. Isolement des souches bactériennes endophytes de *Solanum lycopersicum L.*

Les souches bactériennes ont été isolées à partir de fleurs, de fruits, de feuilles, de pétioles, de racines et de tiges de plants de tomates sains collectés dans six localités de la région du Cap Bon en Tunisie (Tableau 3 ; Annexe 1). Les organes de tomates ont été désinfectés en surface avec une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % pendant 6min et de l'éthanol 70% pendant 1 min et lavés 5 fois avec de l'eau distillée stérile. Chaque échantillon a été découpé de manière aseptique en petits morceaux et déposé sur du milieu LB gélosé. L'efficacité de la désinfection a été vérifiée en versant l'eau du dernier lavage sur du milieu gélosé Luria Bertani (LB). Les boîtes de culture ont été incubées pendant 2 jours à 30°C à l'obscurité, puis les colonies bactériennes apparues ont été étalées sur un nouveau milieu LB gélosé (Figure 16). Les cultures bactériennes obtenues ont été conservées à -20°C dans du milieu LB liquide contenant 25% de glycérol.



**Figure 16.** Etapes de l'isolement des bactéries endophytes. (A) matériels utilisés pour l'isolement, (B) découpage des échantillons en petits morceaux après désinfection et mise sur milieu LB gélosé, (C) boîte de culture contenant l'eau de dernier lavage pour vérification de l'efficacité de la désinfection, (D) apparition des colonies bactériennes autour des organes après 48h d'incubation et (E) culture bactérienne après repiquage et purification des colonies bactériennes sur milieu LB gélosé.

**Tableau 3.** Coordonnées GPS des sites d'échantillonnages des plantes de tomates

<b>Collection</b>	<b>Site</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
<b>Bactéries</b>	Hattouba	36.612373	10.882961
<b>Bactéries</b>	Diar Hajjaj	36.624732	10.863727
<b>Bactéries</b>	Tbag	36.660649	10.857222
<b>Bactéries</b>	Belyess	36.660750	10.871694
<b>Bactéries</b>	Route Korba- Beni Khalled	36.605874	10.750293
<b>Bactéries</b>	Chrifat	36.701490	10.501960

### 1.1.2. Isolement des souches bactériennes endophytes de *Medicago truncatula*

Les souches bactériennes ont été isolées à partir des feuilles et des tiges de plantes de la luzerne tronquée (*M.truncatula*) annuelle collectées dans quatre localités au Nord de la Tunisie (Bulla-Regia, ElKef, Enfidha et Soliman) (Tableau 4). Vingt-cinq plantes de *M.truncatula* saines ont été collectées au hasard sur chaque site avec une marche en avant sur une distance de 100m et un écart de 4m à peu près entre deux plantes successives. La même méthode d'isolement que celle décrite dans la section 1.1.1 a été adoptée. Les souches obtenues pour chaque organe de plante et pour chaque site ont été conservées dans du LB avec 25% de glycérol et à -20°C. L'inoculum bactérien a été préparé par culture des souches bactériennes dans du LB liquide à 30°C à l'obscurité. La reconstitution de chaque consortium bactérien de chaque organe de chaque plante pour chaque site a été faite par mélange des inocula de toutes les souches bactériennes obtenues pour chaque organe pour chaque plante pour chaque site. Les cultures ont été mélangées à une concentration équivalente à 0,5 Mc Farland mesurée par densimètre (Biomérieux, France).

**Tableau 4.** Coordonnées GPS des sites d'échantillonnages des plantes de *Medicago truncatula*

<b>Collection</b>	<b>Site</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
<b>Bactéries</b>	Soliman	36.7084833	10.4254167
<b>Bactéries</b>	Enfidha	36.36965	10.730317
<b>Bactéries</b>	Bulla_Regia	36.5587528	8.7541111
<b>Bactéries</b>	ElKef	36.2359528	8.7891528

### 1.1.3. Souches bactériennes témoins

Les souches bactériennes A281 (*Agrobacterium tumefaciens*), Arqual (*Agrobacterium rhizogenes*), DH5-alpha (*Escherichia coli*) et RCR2011 (*Sinorhizobium meliloti*), ont été généreusement fournies par Pr Martina Rickauer au laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement à Toulouse pour être utilisées comme témoins dans le test d'antagonisme des bactéries isolées à partir de *M. truncatula* contre *P. medicaginis* et *V. alfalfae*.

### 1.2. Souches fongiques

Les souches fongiques S2 et S5 de *Botrytis cinerea* ont été isolées sur du milieu d'extrait de pomme de terre (PDA) à partir des fruits de tomate récoltés dans la localité de Teboulba dans la région du Sahel en Tunisie (Latitude :35.646405 ; Longitude :10.941031).

La souche Pm8 de *P. medicaginis* a été isolé par Djébali et al., (2013) des plantes de *M. truncatula* issues de la région de Bulla-Regia au Nord de la Tunisie. Pour la production des conidies, Pm8 a été repiquée sur milieu Sanderson & Srb (Dhingra et Sinclair, 1995) (Annexe 3) à 25°C à une photopériode de 16h lumière et 8h obscurité.

La souche V31.2 de *V. alfalfae* (anciennement appelée *V. albo-atrum*) a été isolée à partir de racines de luzerne (*Medicago sativa*) à Castanet-Tolosan (France) et identifiée par J. Gondran (INRA, Lusignan, France) en 1977 (Molinéro-Demilly et al., 2007).

Les souches fongiques ont été cultivées par repiquage sur milieu PDA à 25°C à l'obscurité. La conservation des souches a été faite sur milieu PDA incliné dans des tubes Falcon de 15ml à 4°C.

La préparation de l'inoculum de chaque souche fongique a été faite par raclage de la surface de la culture fongique dans 10ml d'eau distillée stérile et l'ajustement de la concentration à 10<sup>6</sup> conidies/ml à été fait à l'aide d'un hémocytomètre (cellule Malassez).

### 1.3. Matériel végétal

Des graines de tomates biologiques de la variété RioGrande ont été utilisées pour les tests de germination. Les fruits de tomate cerise utilisés dans le test de protection *in vivo* ont été achetés sur le marché.

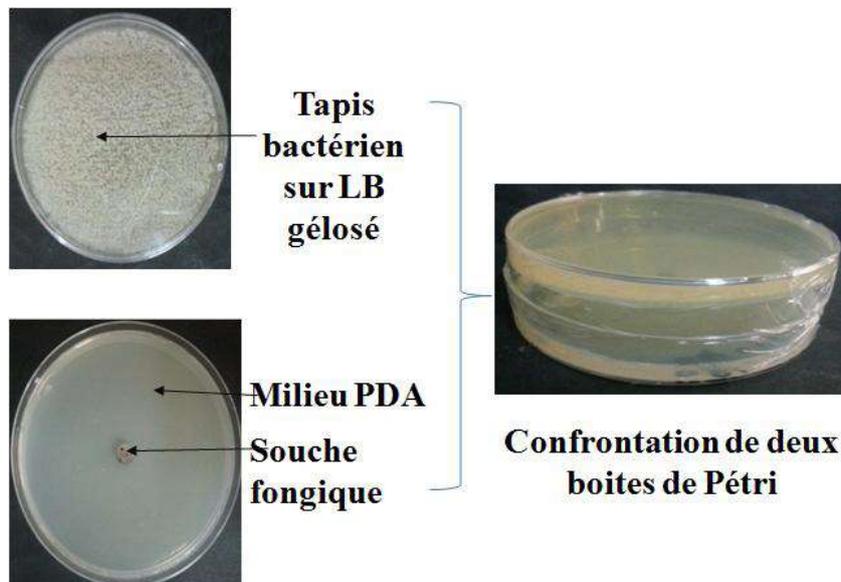
Les graines de *M. truncatula* lignée A17 et F83005.5 (appelée par la suite F83) ont été produites dans le Laboratoire des Substances BioActives au Centre de Biotechnologie de Borj Cedria (Tunisie) et ont été utilisées pour le test de protection *in vivo* et pour l'analyse de l'expression des gènes de défense.

## 2. Test d'activité antifongique des bactéries endophytes

### 2.1. Test d'activité antifongique des souches bactériennes de tomate contre *Botrytis cinerea*

#### 2.1.1. Test d'activité antifongique des composés organiques volatils bactériens contre *Botrytis cinerea*

L'activité antifongique des composés organiques volatiles (COV) bactériens a été évaluée par la méthode des doubles boîtes de Petri (Rouissi et al., 2013). Un disque de 7 mm de diamètre des cultures fongiques S2 et S5 de *B. cinerea* âgées de 7 jours a été transplanté sur milieu PDA 24h avant la confrontation avec la culture bactérienne. Cent  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne âgée de 24h et ajustée à  $10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$  ont été étalés sur du milieu LB gélosé. Les deux boîtes de Petri ont été scellées avec du papier cellophane l'une face à l'autre pour éviter la perte de COV bactériens (Figure 17). Dans les boîtes de Petri témoins, les cultures fongiques ont été placées devant une boîte de Petri de LB gélosé vide. La croissance fongique a été suivie à 7, 14 et 21 jours de confrontation et l'activité antagoniste des souches bactériennes contre les souches fongiques a été évaluée en calculant l'aire sous la courbe de progression de croissance des souches fongiques (AUGPC pour Area Under Growth Progress Curve). Le test a été répété 3 fois.



**Figure 17.** Système de culture du test d'activité antifongique des COVs des bactéries endophytes par la méthode de doubles boîtes

### **2.1.2. Test d'activité antifongique des composés solubles des souches bactériennes endophytes de tomate contre *B. cinerea***

Ce test a été réalisé pour 5 souches bactériennes endophytes de tomate sélectionnées contre les souches S2 et S5 de *B. cinerea*. La souche bactérienne a été repiquée sous forme de stries au milieu d'une boîte de Petri contenant du milieu PDA et deux disques de mycélium (5 mm de diamètre) de cultures de *B. cinerea* âgées de 7 jours ont été placés à 2 cm de part et d'autre de la strie bactérienne. Les boîtes témoins contiennent seulement deux disques de culture fongique. Les boîtes de Petri ont été incubées à 25°C à l'obscurité pendant 7 jours. L'activité antifongique a été évaluée en mesurant le diamètre de la colonie fongique. Le test a été répété deux fois avec trois boîtes de Petri pour chaque traitement.

### **2.1.3. Test d'activité antifongique des composées volatiles pures**

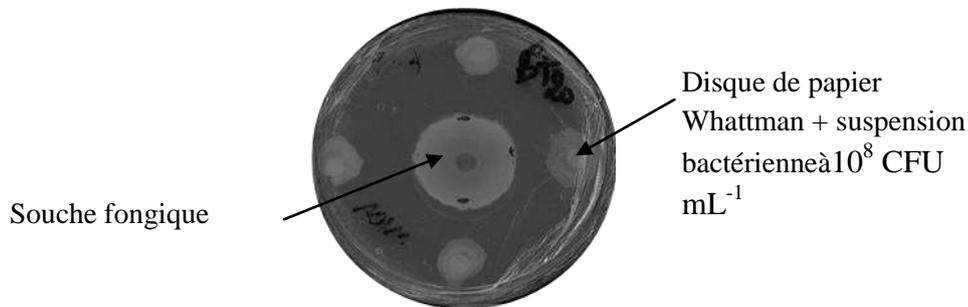
L'activité du composé volatil pur 3-méthylbutan-1-ol (Merck) a été testée *invitro* sur la croissance des souches S2 et S5 de *B. cinerea*. La même méthode décrite dans la section 2.1.1 a été utilisée avec différentes concentrations de 3-méthylbutan-1-ol au lieu des souches bactériennes. La culture fongique a été mise face d'une boîte de Petri contenant un disque de papier Whatman de 13 mm de diamètre imprégné de différentes concentrations du composé pur allant de 0,004 à 0,885 mL L<sup>-1</sup> de volume d'air. Les boîtes de Petri ont été scellées avec du papier cellophane et incubées pendant 5 jours à 25°C à l'obscurité. Les concentrations minimales de 3-méthylbutan-1-ol qui réduisent 50% (CMI50) et 100% (CMI100) la croissance de *B. cinerea* ont été calculées sur la base de courbe de tendance en utilisant la méthode Probit. Trois boîtes Petri par souche fongique et concentration de composé volatil ont été utilisées et l'expérience a été répétée deux fois.

## **2.2. Test d'activité antifongique des consortia bactériens de *M. truncatula* contre *P. medicaginis* et *V. alfalfae***

### **2.2.1. Test d'activité antifongique des cellules végétatives des consortia bactériens**

L'activité antifongique des cellules bactériennes de chaque consortium a été évaluée. Un disque de 6 mm de diamètre de la culture fongique âgée de 21 jours de la souche Pm8 de *P. medicaginis* ou V31.2 de *V. alfalfae* a été transplanté au centre d'une boîte de Petri sur milieu PDA. Cinquante µL du mélange bactérien et ajusté à 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> a été mis sur 4 disques de papier Whatman à une distance de 2,5 cm du disque fongique (Figure 18). Dans les boîtes témoins, le milieu LB liquide a été utilisé à la place des suspensions bactériennes. L'expérience a été réalisée en « augmented block design » avec 4 'checks' (ou souches de

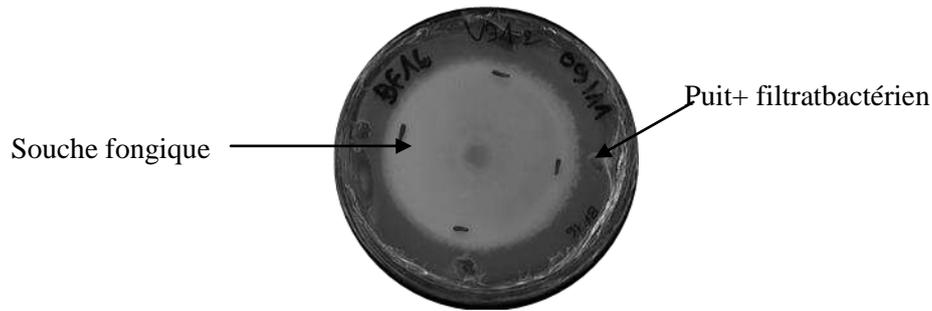
référence) évalués dans tous les blocs : Arqua1 (*Agrobacterium rhizogenes*), DH5-alpha (*Escherichia coli*), RCR2011 (*Sinorhizobium meliloti*), A281 (*Agrobacterium tumefaciens*). La croissance fongique a été suivie à 7 et 14 jours et l'activité antifongique des consortia bactériens contre les souches fongiques a été évaluée en calculant l'aire sous la courbe de progression de croissance (AUGPC).



**Figure 18.** Système de culture pour tester l'activité antifongique des cellules végétatives des consortia bactériens contre les agents phytopathogènes

### 2.2.2. Test d'activité antifongique des filtrats des consortia bactériens

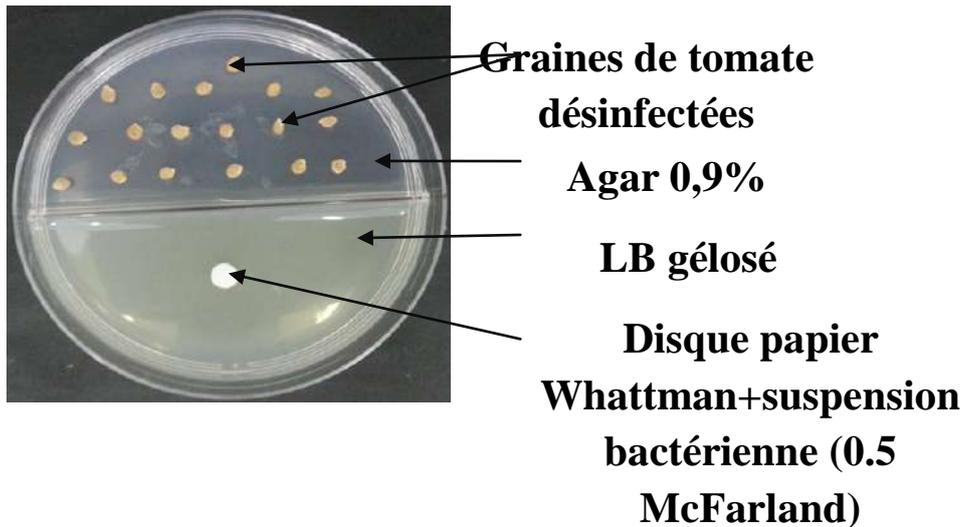
L'activité antifongique des substances bactériennes diffusées de chaque consortium bactérien a été évaluée. La méthode de diffusion en puits a été utilisée pour ce test (Figure 19). Un disque de 6 mm de diamètre de la culture fongique âgée de 21 jours de Pm8 ou V31.2 a été transplanté au centre d'une boîte de Petri sur milieu PDA. Trente  $\mu$ L du filtrat de chaque consortium (centrifugation de la suspension bactérienne à 13000 rpm pendant 15 min et filtration par un filtre 0,25 $\mu$ m) a été mise dans 4 puits à une distance de 2,5 cm du la culture fongique. Dans les témoins, le milieu LB liquide a été utilisé à la place des surnageants bactériens. L'expérience a été réalisé en « augmented block design » avec 4 'checks' qui se répètent dans tous les blocs (*A. rhizogenes*Arqua1, *E. coli*DH5-alpha, *S. meliloti*RCR2011, *A.tumefaciens*A281). La croissance fongique a été suivie à 7 et 14 jours et l'activité antifongique des consortia bactériens contre les souches fongiques a été évaluée en calculant l'aire sous la courbe de progression de la croissance (AUGPC).



**Figure 19.** Système de culture pour tester l'activité antifongique des substances solubles des consortia bactériens contre les agents phytopathogènes

### 3. Test d'activité *in vitro* des COVs des bactéries endophytes sur la croissance des plantules de tomate

Les graines de tomates ont été désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 3% pendant 6 min et de l'éthanol à 70% pendant 1 min, puis lavées 5 fois avec de l'eau distillée stérile. L'efficacité de la méthode de désinfection de la surface des graines de tomate a été vérifiée en étalant 100  $\mu\text{L}$  de l'eau du dernier lavage sur du milieu LB solide. Les souches bactériennes ont été cultivées dans du LB liquide pendant 24 h à 30°C à l'obscurité dans un incubateur avec agitation de 150 tr/min. Chaque culture bactérienne a été mise en suspension dans une solution saline physiologique (0,9% NaCl) et ajustée à  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  à l'aide d'un densimètre (Biomérieux). Le test a été réalisé dans des boîtes de Petri à double compartiment, dans un compartiment un disque de papier Whatman stérile (6 mm de diamètre) inoculé avec 50  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne a été placé sur du milieu LB gélosé et dans le deuxième compartiment 20 graines de tomate désinfectées ont été placées sur milieu agar 0,9% (Figure 20). La germination des graines a été suivie pendant 6 jours de co-culture. A la fin de l'expérience, la longueur et le poids frais et sec des plantules ont été mesurés.



**Figure 20.** Système de culture pour tester l'effet des composés organiques volatils bactériens sur la germination des graines de tomates

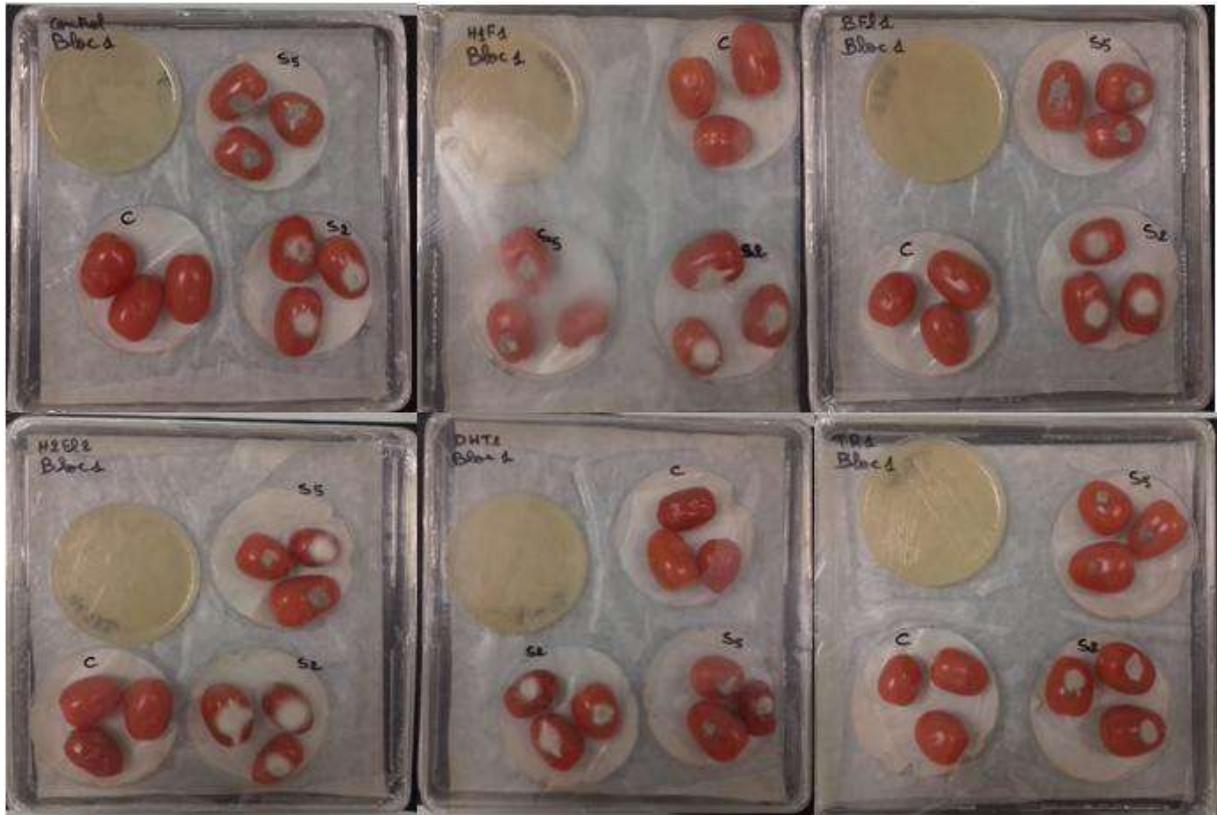
#### **4. Essais de bio-protection *in vivo***

##### **4.1. Test de bio-protection des fruits de tomate par les COVs bactériens contre *Botrytis cinerea***

Des fruits de tomate exempts de plaies de taille et de stade de maturité comparables ont été utilisés dans cet essai. Les fruits ont été désinfectés par de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 30 min, puis rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, un trou de 6 mm de diamètre a été réalisé dans la peau du fruit et un disque mycélien fongique de 5 mm des souches S2 ou S5 de *B.cinerea* a été déposé. Les fruits inoculés ont été placés dans des boîtes en plastique en présence d'une culture bactérienne de 24h sur milieu LB solide. Les fruits témoins ont été inoculés par des disques PDA. Les boîtes contenant deux papiers filtres imbibés d'eau distillée stérile pour maintenir une humidité élevée ont été scellées avec du papier cellophane pour empêcher la libération des COV bactériens et incubées à l'obscurité à  $24 \pm 2$  °C. Le degré d'infection par *B. cinerea* sur les fruits a été estimé en mesurant le diamètre et la profondeur de la zone macérée des tissus due à la colonisation fongique à 6 jours après inoculation.

Un dispositif expérimental en split plot a été utilisé dans cet essai (Figure 21). Chaque boîte en plastique contient les trois traitements fongiques différents à savoir fruits non infectés et les fruits infectés par la souche S2 ou S5 et une boîte de Petri avec une souche bactérienne

antagoniste sur milieu LB gélosé ou sans culture bactérienne pour le témoin. Le test a été répété trois fois avec deux répétitions techniques par traitement.



**Figure 21.** Système expérimental pour tester l'effet bio-protecteur des COVs bactériens sur les fruits de la tomate contre l'infection par *B. cinerea*

#### **4.2. Test de bio-protection des fruits de tomate par des cellules végétatives bactériennes contre *Botrytis cinerea***

Le même dispositif expérimental que celui décrit dans la section 4.1. a été utilisé dans cet essai sauf que les fruits de tomate ont été trempés dans une suspension bactérienne de  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> pendant 30 min, puis ressuyés sur papier filtre autoclavé sous hotte à flux laminaire. Un dispositif expérimental en split plot a été utilisé dans ce test et l'expérience a été répétée trois fois avec deux répétitions techniques par traitement. Le degré d'infection par *B. cinerea* sur les tomates a été estimé comme décrit dans la section 4.1.

#### **4.3. Test de bio-protection des fruits de tomate par le composé volatil pur**

Le même système expérimental que celui décrit dans la section 4.1 a été utilisé pour tester l'effet de 3-méthylbutan-1-ol sur l'infection du *B. cinerea* sur les fruits de tomate. Le composé volatil pur a été déposé sur du papier Whatman de 90 mm de diamètre placé dans le centre de la boîte. Deux concentrations, à savoir CMI50 = 0,221 mL L<sup>-1</sup> de volume d'air et

CMI 100 = 0,442 mL L<sup>-1</sup> de volume d'air, ont été testées. Des fruits de tomate cerise ont été inoculés avec un disque de 6 mm de diamètre des souches S2 et S5 de *B. cinerea* et incubés à l'obscurité à 24 ± 2 ° C. L'infection fongique sur les fruits de tomate a été évaluée comme décrit dans la section 4.1. Un dispositif expérimental en split plot a été utilisé dans ce test comme décrit précédemment dans la section 4.1. Chaque boîte contient les trois traitements fongiques, c'est-à-dire les fruits non infectés et les fruits infectés par la souche S2 ou S5 en présence de papier filtre imprégné de 3-méthylbutan-1-ol. Les boîtes témoins contiennent du papier filtre seul. Le test a été répété deux fois, avec 3 fruits pour chaque traitement.

#### **4.4. Test de bio-protection *in vivo* des plantules de *Medicago truncatula***

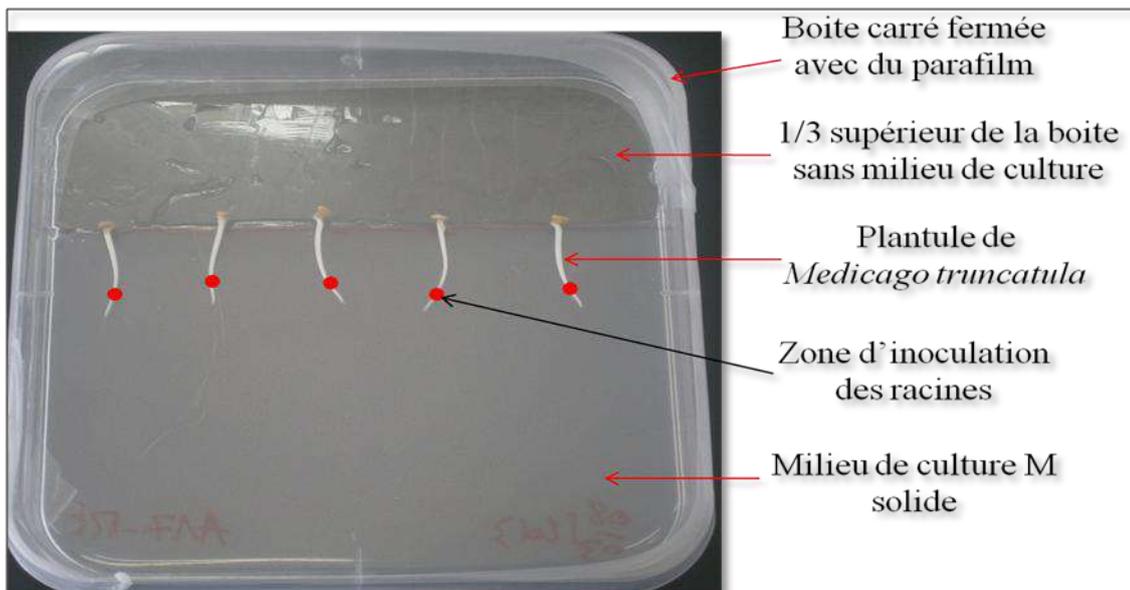
##### **4.4.1. Germination des graines et inoculation par les bactéries**

Les graines de lignées de *M. truncatula* A17 et F83005.5 ont été mises dans l'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pendant 5 à 6 min ensuite lavées 5 fois à l'eau distillée stérile. Une suspension du consortium bactérien endophyte choisi pour son activité antifongique contre Pm8 et V31.2 a été préparée dans une solution saline physiologique (0,9% NaCl) et ajustée à 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> à l'aide d'un densimètre (Biomérieux). Les graines ont ensuite été imbibées dans cette suspension pendant 2h avec agitation pour enrober les graines. Les graines témoins ont été imbibées dans de l'eau distillée stérile. Les graines ont été transférées sur papier filtre imbibé d'eau distillée stérile dans des boîtes de Petri. Les boîtes ont été mises à 4°C et à l'obscurité pendant deux nuits pour lever la dormance des graines et permettre ainsi une meilleure synchronisation de leur germination. Après 2 nuits les graines ont été transférées dans un incubateur à 24°C et à l'obscurité jusqu'à l'émergence de leurs racines.

##### **4.4.2. Test de bio-protection des plantes de *M. truncatula* contre *P. medicaginis***

Les graines de *M. truncatula* germées et prétraitées par la suspension bactérienne (du consortium choisi) ont été transplantées dans les boîtes carrées (12 cm\*12 cm) contenant du milieu M (Annexe 2) à raison de 5 plantules par boîte (Figure 22). Les boîtes ont ensuite été incubées à 25°C sous une photopériode de 16h lumière et 8h obscurité (100μE). Après 48h, les plantules ont été inoculées par 5μl d'une suspension de conidies de *P. medicaginis* à 10<sup>6</sup> conidies/ml au niveau de l'extrémité inférieure de la racine principale à environ 3-5mm de l'apex racinaire (Figure 22). Quatre traitements ont été considérés dans cet essai à savoir des plantules témoins sans inoculation par les bactéries et *P. medicaginis*, des plantules inoculées seulement par le mélange bactérien, des plantules inoculées par le mélange bactérien et par Pm8. Les plantules témoins ont été inoculées avec de l'eau distillée stérile. Un dispositif expérimental RCBD (Randomized Complete Block Design) a été adopté dans cet essai.

Les plantules ont été suivies jusqu'à 21j après inoculation par Pm8. Les paramètres de croissance - à savoir le nombre des feuilles vertes (NFV), nombre des racines secondaires (NRS) et longueur des racines (LR) - et ceux de pathologie - à savoir la longueur du brunissement (BR) et le score des pycnides (PYC) - ont été mesurés à 7j, 15j et 21j après inoculation par Pm8. Le poids frais des feuilles (PFF) et des racines (PFR) des plantules ont été mesurés à 21j après inoculation par Pm8.



**Figure 22.** Système de culture *in vitro* des plantules de *Medicago truncatula*.

#### 4.4.3. Test de bio-protection des plantules de *M. truncatula* contre *V. alfalfae*

Les graines germées et prétraitées par le mélange bactérien et âgées de 24h ont été repiquées dans des pots contenant 25g de terreau. Les pots ont été mis dans une chambre de culture à une température de 25°C, une photopériode de 16h lumière /8h obscurité et une intensité lumineuse de 100  $\mu$ E. Les plantules de *M. truncatula* ont été inoculées 10j après repiquage sur terreau par la coupure des racines de chaque plante et leur imbibition dans la suspension de conidies de V31.2 pendant 30 min. Les plantules témoins ont été inoculées avec de l'eau distillée stérile. Un dispositif expérimental en split plot a été adopté pour cet essai. Quatre traitements ont été évalués : plante témoins, plantes inoculées par le consortium, plantes inoculées par la souche fongique V31.2 et plantes inoculées par le consortium et la souche fongique V31.2. Les plantules ont été suivies 45j après inoculation par V31.2. Le score d'infection a été mesuré tous les 5j jusqu'à 45j après inoculation par V31.2. L'AUDPC (aire sous la courbe de progression de la maladie) et le MSS (score maximal de symptômes en fin d'expérience) ont été calculés. Le poids frais des plantules (PFF) a été mesuré après 45j de l'inoculation.

## **5. Caractérisation moléculaire des souches bactériennes**

### **5.1. Extraction de l'ADN génomique bactérien**

L'extraction de l'ADN génomique des souches de bactéries a été faite selon la méthode décrite par Andreou (2013) avec quelques modifications. L'extraction de l'ADN génomique a été faite à partir des culots bactériens récupérés après une centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min à température ambiante de 1.5 ml de culture liquide de chaque bactérie. Le culot bactérien a été lavé avec 200 µl de tampon TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA) puis les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min. Par la suite, le culot a été repris dans 1 ml de TES (tampon de lyse : Tris 0.05 M, pH 8, EDTA 1 mM et saccharose 25 %) et 40 µl de lysosyme (2 mg/ml; solution mère de concentration 50 mg/ml). Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 30 à 45 min. Quarante µl de SDS 20% additionné de 50µg/ml de protéinase K (solution mère de concentration 20 mg/ml) ont été rajoutés au mélange avant leur incubation à 55°C jusqu'à l'obtention d'un lysat clair et visqueux. Afin de stopper la réaction, 10 µl d'EDTA (0.25 M, pH 8) ont été rajoutés aux solutions. Le volume est ensuite divisé sur 2 tubes, 500µl de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) a été alors rajouté à chaque tube et les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min. Cette opération a été répétée 3 fois. La phase aqueuse a été récupérée et additionnée de 500 µl d'éthanol 100 % et de 50 µl d'une solution d'acétate de sodium 3 M. Les tubes ont été placés 15 min dans la glace puis ils ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été suspendu dans 100 µl d'éthanol 70% et centrifugé à nouveau. Le culot a été séché après l'élimination de l'éthanol puis re-suspendu dans de l'eau milliQ stérile (50µl). La qualité de l'ADN extrait a été appréciée par migration sur gel d'agarose 1% [p/v] dans un tampon TBE (1X). La qualité d'ADN extrait est ensuite vérifiée par mesure de la concentration d'ADN (ng/µl) à l'aide d'un Nanodrop(Thermo Fisher Scientific, USA).

### **5.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Le gène 16S d'ADNr (amorces de référence fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3') et rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG C-3') (Weisburg et al., 1991)) et le gène Tuf (tufGPF (5' -ACGTTGACTGCCAGGACAC-3') et tufGPR(5' -GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA-3')) ont été amplifiés par une PCR classique selon le mélange réactionnel et le programme d'amplification mentionnés dans les Tableaux 5 et 6, respectivement.

**Tableau 5.** Mélange réactionnel pour la PCR pour l'amplification de la région 16S et du facteur d'élongation Tuf de l'ADN des souches bactériennes

Master Mix ( $\mu\text{L}$ )	Volume	Concentration Finale
ADNg (5ng/ $\mu\text{L}$ )	2,5	-
10x PCR Buffer	2,5	1x
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,25	2,5mM
1,25mM dNTPs	4	0,2mM
5 $\mu\text{M}$ Amorce sens	2	0,4 $\mu\text{M}$
5 $\mu\text{M}$ Amorce anti-sens	2	0,4 $\mu\text{M}$
TaqPolymerase	0,25	-
H <sub>2</sub> O	10,5	-
Total	25	-

**Tableau 6.** Programme de PCR utilisé pour l'amplification de la région 16S d'ADN bactérien et du facteur d'élongation Tuf

Étape	Température (°C)	Durée (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale d'ADN	95	3	1
Dénaturation de l'ADN	94	1	
Hybridation des amorces sur les brins d'ADN (T <sub>m</sub> )	55	1	35
Néoformation des brins d'ADN grâce à la Taq polymérase (Elongation)	72	2	
Elongation finale	72	3	1
$\infty$	15	-	-

La migration des amplifiats a été réalisée à l'aide d'un générateur sous une tension de 100 V pendant 30 min sur gel d'agarose(Sigma-Aldrich, USA) de densité 1%(1g/100ml de TAE (40 mM Trisacétate, 1 mM EDTA)) sur une cuve de migration (BioRad, USA). Les amplifiats ont été additionnés de 5  $\mu$ L de bleu de charge et déposés dans les puits du gel à raison de 10  $\mu$ L. Le marqueur de taille 1 kb (Promega, USA) a été utilisé à raison de 5  $\mu$ L par puit. La visualisation des bandes recherchées a été faite à l'aide solution de bromure d'éthidium (BET) (1 $\mu$ g / mL) et l'observation du gel sous UV (Sambrook *et al.*, 1989).

### 5.3. Purification des produits PCR

Une méthode enzymatique a été utilisée pour purifier les produits PCR à l'ExoSAP (mélange de deux enzymes Exonucléase 1 pour éliminer le reste des amorces et la Shrimp Phosphatase Alcaline (SAP) pour éliminer le reste des dNTPs). Le mélange réactionnel et le programme utilisé pour la purification des produits PCR sont mentionnés dans les tableaux 7 et 8, respectivement.

**Tableau 7.** Mélange réactionnel pour purification des produits PCR

<b>Produits</b>	<b>Concentration</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Produit PCR</b>	-	5
<b>Exonucléase I</b>	20 U/ $\mu$ L	0,25
<b>FastAP</b>	1 U/ $\mu$ L	0,5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	0,25

**Tableau 8.** Programme de purification des produits PCR

<b>Température (°C)</b>	<b>Temps(min)</b>
37	15
85	15
15	$\infty$

#### 5.4. Séquençage de l'ADN

La réaction de séquence a été faite à l'aide d'un Kit BigDye Terminator selon le mélange réactionnel et le programme mentionnés dans le tableau 9 et 10, respectivement.

**Tableau 9.** Mélange réactionnel pour la réaction de séquençage des produits PCR purifiés

<b>Mix (µL)</b>	<b>Concentration</b>	<b>Volume (µl)</b>
BigDyeTerminator3.1	2,5 X	1
BDT Buffer	5X	3,5
Amorce utilisé (sens ou anti-sens)	5µM	1
H <sub>2</sub> O	-	12,5
Produit PCR purifié	80 ng/µl	2
Total	-	20

**Tableau 10.** Programme de réaction de séquençage des produits PCR purifiés

<b>Température (°C)</b>	<b>Durée (min)</b>	<b>Nombre de cycle</b>
95	5	1
96	0,5	
55	15	38
60	4	
4	-	-

La méthode de séquençage Sanger a été utilisée pour obtenir les séquences nucléotidiques d'ADNr 16S des souches bactériennes.

## 5.5. Assemblage, alignement et construction de l'arbre phylogénétique des souches bactériennes

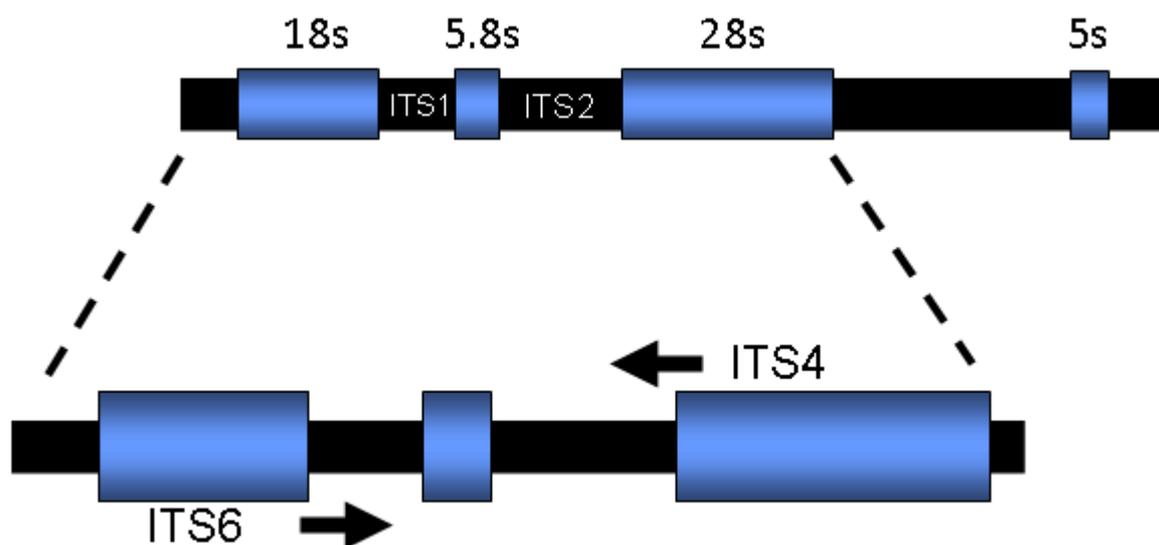
Les séquences nucléotidiques ont été assemblées, alignées avec le logiciel BioEdit et déposées dans GenBank et les numéros d'accessions ont été obtenus. Un arbre phylogénétique (Neighbor Joining) des souches bactériennes basées sur les séquences d'ADNr 16S a été construit. Les séquences d'ADNr 16S des souches bactériennes N2-8 de *Streptomyces sp.* et NBRC 15309 de *Paenibacillus polymyxa* ont été utilisées comme des « Out-group » et ont été alignées en utilisant le logiciel Bioedit. Des valeurs bootstrap > 50% d'un échantillon de 1000 répliques ont été prises en compte. La construction de l'arbre phylogénétique a été réalisée sous R à l'aide des packages ape (Paradis et Schliep, 2018) et phangron (Schliep, 2011; Schliep et al., 2017).

## 6. Caractérisation moléculaire des souches de *Botrytis cinerea*

### 6.1. Extraction de l'ADN fongique et PCR

Les conidies des souches S2 et S5 de *B. cinerea* ( $\approx 150$  mg de matière fraîche fongique) ont été mises dans des tubes Eppendorf stériles de 2 mL contenant 300  $\mu$ L de TES (0,2 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,5 M NaCl et 1% SDS) et des billes en verres. Les tubes ont été mis dans un bloc chauffant (hand-held) pendant 1 h à 100°C pour éclater les conidies. Après chauffage le tube a été vigoureusement agité au vortex pendant 30 s et 200  $\mu$ L de la solution de lyse TES ont été ajoutés. Le mélange a été vortexé jusqu'à homogénéisation totale de la solution. Le tube a été par la suite placé dans un bain marie pendant 30 min à 65°C. Deux cent cinquante  $\mu$ L d'acétate d'ammonium (7,5 M) ont été ajoutés au mélange, suivi d'une centrifugation pendant 5 min à 14000 g. Le surnageant obtenu a été transféré dans un nouveau tube et 300  $\mu$ L d'isopropanol ont été ajoutés. Le tube a été ensuite incubé pendant 2h à -20°C puis centrifugé durant 10 min à 14000 g. Le surnageant est éliminé et 500  $\mu$ L d'éthanol 70 % sont ajoutés au culot d'ADN. Après séchage sous la hotte pendant 10 à 15 min, le culot d'ADN est re-suspendu dans 100  $\mu$ L de TE (10mM Tris 10mM EDTA, pH 8) et conservé à -20°C jusqu'à utilisation (Mahuku, 2004).

Les régions ITS (Internal transcribed spacer) de l'ARN ribosomal ont été amplifiées en utilisant les amorces ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) (Figure 23). Le volume réactionnel est indiqué dans le tableau 11.



**Figure 23.** Représentation schématique de la structure de l'ARN ribosomique chez les champignons et de l'emplacement des amorces ITS4 et ITS6 pour l'amplification des régions ITS. Les gènes d'ARN ribosomique nucléaire (ARNr) (petite sous-unité, grande sous-unité et 5.8S) sont organisés dans un cluster mais séparés par deux régions internes transcrites mais non traduites (ITS1 et ITS2).

**Tableau 11.** Composition du milieu réactionnel de la PCR.

Produit	Concentration	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Tampon	-	3
dNTPs	10 $\mu\text{M}$	0,4
ITS6 (sens)	10mM	0,4
ITS4 (anti-sens)	10mM	0,4
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2
Taq	5U/ $\mu\text{l}$	0,1
ADN	50ng/ $\mu\text{l}$	1
H <sub>2</sub> O	-	7,7

La PCR a été faite dans un thermocycleur Master Cycler Gradient (Eppendorf) selon le programme indiqué dans le tableau 12. La température d'hybridation de l'amplifiat et le nombre de cycles sont établis selon la longueur et la nature des amorces utilisées.

**Tableau 12.** Programme PCR utilisé pour l'amplification d'ADN

<b>Étape</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Durée (min)</b>	<b>Nombre de cycle</b>
<b>Dénaturation initiale d'ADN</b>	<b>95</b>	<b>7</b>	<b>1</b>
<b>Dénaturation de l'ADN</b>	<b>94</b>	<b>1</b>	<b>35</b>
<b>Hybridation des amorces sur les brins d'ADN (T<sub>m</sub>)</b>	<b>55</b>	<b>1</b>	
<b>Néoformation des brins d'ADN grâce à la Taq polymérase (Elongation)</b>	<b>72</b>	<b>1,05</b>	
<b>Elongation finale</b>	<b>72</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>∞</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

La migration des amplifiats a été réalisée telle que décrite précédemment (section 5.2).

## **6.2. Purification des bandes à partir du gel et séquençage de l'ADN**

Cette méthode de purification des produits PCR consiste à découper le fragment à purifier à partir du gel d'agarose et à le mettre dans un tube d'Eppendorf muni d'un bout de fibre de verre afin de filtrer le morceau de gel en question.

Le séquençage de l'ADN est réalisé tel que décrit précédemment (section 5.4).

### **6.3. Assemblage, alignement et construction de l'arbre phylogénétique des souches fongiques**

Les séquences nucléotidiques ont été assemblées à l'aide du programme CAP disponible sur le site Web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Les séquences obtenues ont été déposées sur le site Web du NCBI et les numéros d'accessions ont été obtenus. Les séquences de différentes espèces de *Botrytis* et des genres hors groupe (« Out-group ») comme *Saccharomyces cerevisiae* CBS: 1201, *Aspergillus niger* ATCC 16888, *Beauveria bassiana* CIDDB38, *Fusarium sambucinum* 166A, *Parastagonospora nodorum* ont été alignées à l'aide du logiciel Bioedit. Un arbre phylogénétique des souches fongiques a été construit. Des valeurs bootstrap > 50% d'un échantillon de 1000 répliques ont été prises en compte. La construction de l'arbre phylogénétique dans R a été réalisée à l'aide de packages ape (Paradis et Schliep, 2019) et phangron (Schliep, 2011; Schliep et al., 2017) pour l'étude phylogénétique.

## **7. Caractérisation biochimique des souches bactériennes endophytes de tomate**

La caractérisation biochimique de souches de bactéries sélectionnées a été réalisée sur la base de leurs activités enzymatiques, de la production des sidérophores, de la production de cyanure d'hydrogène (HCN), de la production d'ammoniac et de la solubilisation du phosphate. Les activités cellulase (Gupta et al., 2012), pectinase (Hankin et al., 1971), phytases (Kerovuo et al., 1998), xylanase (Khan et al., 1986), amylase (Vaseekaran et al., 2011), protéase (Durham et al., 1987) et chitinase (Hsu and Lockwood, 1975) ont été testées sur des milieux minimaux (Annexe 4) contenant respectivement de la cellulose, de la pectine, du myoinositol, du xylane, de l'amidon, de la caséine et de la chitine colloïdale. La production d'enzymes a été détectée par la formation d'une zone circulaire claire autour de la colonie bactérienne. La production de sidérophores a été détectée par culture des bactéries sur milieu CAS Agar (Schwyn and Neilands, 1987) (Annexe 5). Lorsque les sidérophores sont produits, ils éliminent le fer du complexe colorant et la couleur du milieu passe du bleu à l'orange. Le milieu PVK a été utilisé pour tester la solubilisation du phosphate par des souches bactériennes (Pikovskaya, 1948) (Annexe 6). Une zone circulaire claire autour de la colonie bactérienne est formée si la souche bactérienne a la capacité de solubiliser le phosphate. La production d'ammoniac a été testée sur de l'eau peptonée additionnée du réactif Nessler (Cappuccino et Sherman, 1992). Le changement de la couleur de la suspension bactérienne du jaune au brun indique la production d'ammoniac. La production de HCN a été mesurée sur du

papier Whatman trempé dans une solution 2,5 g L<sup>-1</sup> d'acide picrique contenant 12,5 g L<sup>-1</sup> de carbonate de sodium placé à l'intérieur du couvercle de la boîte de Petri. Des stries bactériennes ont été réalisées sur du milieu LB agar amendé avec de la glycine (4,4 g L<sup>-1</sup>). Les boîtes ont ensuite été scellées avec du cellophane et incubées à 30°C pendant 4 jours. Un changement de la couleur du papier filtre du jaune foncé au brun rougeâtre a été considéré comme une indication de la production de HCN (Bakker and Schippers, 1987).

## **8. Analyse des substances volatiles par SPME-Chromatographie en phase gazeuse - Spectromètre de masse (SPME-GC-MS)**

Les flacons « Headspace » (20 ml) ont été remplis avec 6 ml de milieu LB gélosé et autoclavés. Les bactéries sélectionnées ont été inoculées dans les flacons préparés et incubées à 30°C à l'obscurité pendant 7 et 14 jours. Des flacons contenant du milieu d'agar LB sans bactéries ont été utilisés comme témoins. Les VOC bactériens ont été collectés en utilisant la fibre SPME (Carboxen / DVB / PDMS (2 cm) 50/30 µm) (Agilent Technologies, USA). La fibre a été conditionnée à 250°C pendant 30 min dans l'injecteur chaud du GC puis exposée à l'espace des flacons de culture pendant 1h. Une fois l'adsorption / absorption terminée, la fibre a été désorbée dans l'injecteur en mode « splitless » (5 min) avec une température de ligne de transfert de 260 °C. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée en utilisant un GC Agilent 19091S-433: 2169.66548 couplé à un HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox avec une colonne capillaire DB Wax (325 ° C: 30 mx 250 µm x 0,25 µm) et de l'hélium comme support gaz à un débit de 1 mL min<sup>-1</sup>. Le programme de température du four a été fixé à 40°C pendant 5 min, suivi d'une augmentation de 20°C min<sup>-1</sup> jusqu'à 250°C avec maintien pendant 15 min. L'identification des différents composés a été réalisée en faisant correspondre les spectres de masse enregistrés avec ceux stockés dans la bibliothèque de spectres de masse Wiley 09 NIST 2011 du système de données GC-MS. L'expérience a été répétée deux fois avec deux répliques par souche par temps d'incubation.

## **9. Etude de l'expression de quelques gènes de défense chez les plantes de *Medicago truncatula* immunisées par le consortium et soumises à l'attaque par *Phoma medicaginis***

### **9.1. Matériel biologique**

Les parties aériennes et racinaires des plantes de *M.truncatula* ont été récoltées à 0 et 24h après infection et ont été mises directement dans l'azote liquide puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

### **9.2. Extraction del'ARN**

Les ARN totaux ont été extraits des plantules de la lignée A17 (feuilles et racines) de *M. truncatula* récoltées à deux temps : avant l'inoculation (0h) par la souche fongique Pm8 (des plantules cultivées en condition contrôle et des plantules pré-inoculées par BF25) et après l'inoculation (24h) par Pm8 (des plantules prétraitées par l'eau distillée et des plantules pré-inoculées par BF25) en suivant le protocole décrit par Abid et al. (2012). Hormis le Tris – HCl, tous les réactifs ont été préparés avec de l'eau traitée au DEPC. Les plantules (100mg de chaque échantillon) ont été broyées en une poudre fine avec l'azote liquide. Ensuite, 700 µl de du tampon d'extraction chaud (65°C) (100 mM Tris – HCl pH 8,25 mM EDTA pH 8,2 M NaCl, 2% CTAB, 2% polyvinylpyrrolidone (PVP), 2% β-mercaptoéthanol) ont été ajoutés et le mélange a été homogénéisé par vortex pendant 2 min. Un volume égal (700 µl) de chloroforme / alcool isoamylique (24:1) a été ajouté, vortexé pendant 2 min et centrifugé pendant 10 min à 14 000 x g à température ambiante, et le surnageant a été recueilli. Pour la précipitation de l'ARN, 1/4 V de LiCl 10 M a été ajouté, le mélange a été inversé cinq fois, incubé pendant une nuit à 4°C et centrifugé pendant 15 minutes à 14 000 x g (4°C); le culot a été remis en suspension dans 200 µl d'eau traitée au DEPC, puis 2,5 V éthanol (EtOH) et 1/10 V de acétate de sodium (NaAc) 3M pH 5,2 ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 15 min à -80°C et centrifugé pendant 15 min à 14 000 x g (4°C); le culot a été lavé deux fois avec 500 µl d'EtOH à 70%, puis séché et L'ARN obtenu est re-suspendu dans 20µl d'eau DEPC (1% diéthylpyrocarbonate). L'ARN obtenu a été quantifié en utilisant un NanodropSpectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) et les échantillons d'ARN ont été conservé à -80 °C pour la suite des analyses.

### 9.3. La qRT-PCR pour l'étude de l'expression des gènes

#### 9.3.1. Traitement à la DNase

Le traitement à la DNase a été réalisé avec un kit DNase Kit RQ1 RNase – Free DNase (Promega). Le milieu réactionnel est composé de Reaction buffer et RNase Free DNase et de l'ARN. Les échantillons ont été incubés à 37°C pour 30min ; par la suite la RQ1 DNase stop solution est ajoutée pour terminer la réaction. Cette étape est suivie d'une incubation à 65°C pour 10min pour désactiver la DNase.

#### 9.3.2. Synthèse de l'ADNc

Le kit K5147-M-MuLV First Strand cDNA Synthesis (BIOMATIK) a été utilisé pour la synthèse de l'ADNc. Une première étape consiste à préparer un mélange réactionnel contenant l'ARN isolé, Random Primers, dNTP mix et l'eau nuclease free (Tableau 13). Ce mélange a été mis en incubation à 65 °C pour 5 min puis incubé dans la glace pour une minute. Une centrifugation rapide a été faite puis 5X RT buffer, RNase Inhibitor et M-MuLV Reverse Transcriptase ont été ajoutés au mix (Tableau 14). Une centrifugation rapide a été faite pour bien mélanger tous les composés puis une incubation à 25°C a été faite pendant 10 min ensuite une incubation à 42°C pendant 50 min a été faite pour la synthèse de l'ADNc. Pour stopper la réaction, une incubation à 85°C pour 5min a été faite. L'ADNc obtenue est ensuite stocké à -20 °C.

**Tableau 13.** Mélange réactionnel de la première étape de la synthèse de l'ADNc.

<b>Produits</b>	<b>Concentration Finale</b>	<b>Volume unité (µl)</b>
ARN	2 ng/rxn	Variable
Random Primers (10µM)	0,5 µM	1
dNTP mix (10mM chacune)	500 µM	1
Eau nuclease free	-	Variable

**Tableau 14.** Mélange réactionnel de l'étape de la transcriptase inverse

Produits	Concentration Finale	Volume unité (µl)
5X RT buffer	1X	4 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	20 U/rxn	0,5 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	200 U/rxn	µl

### 9.3.3. PCR semi-quantitative

Les fragments ont été amplifiés à partir d'ADNc en utilisant les différentes amorces des gènes de ménage et cibles (Annexe 7). L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant le programme suivant: 3 min à 95°C, 35 cycles pendant 30 s à 95°C, 30 s à 58°C et 30 s à 72°C. Une étape d'élongation de 72°C pendant 1 min a été réalisée pour le dernier cycle. Les réactions ont été effectuées dans un cycleur thermique Minicycler (BioRad iCycler). Les produits de PCR amplifiés (20 µl) ont été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (p / v), colorés avec du runSAFE (Cleaver Scientific), puis scannés à l'aide d'un analyseur d'image (Gel Doc BioRad).

### 9.3.4. PCR quantitative

Les expériences de PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant la chimie SYBR Green pour la détection d'amplicons. Les dosages SYBR Green ont été réalisés sur l'instrument de PCR en temps réel ABI7500 FAST (Applied Biosystems). L'amplification des gènes cibles, ainsi qu'un gène de ménage, a été réalisée en triple dans une plaque à 96 puits. Chaque 25 µl de mélange réactionnel contenait 10 µl d'ADNc, 12,5 µl de 2X SYBR Green Master Mix, 0,3 µl de chaque amorce sens et anti-sens et 2 µl de H<sub>2</sub>O. Les amorces ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3 (elles sont répertoriées dans l'Annexe 8). Les conditions d'amplification comprenaient un cycle de 10 min à 95°C suivi de 40 cycles à 95°C pendant 10 s, 60°C pendant 30 s et 82°C pendant 30 s. La fluorescence a été mesurée à 82°C pendant chaque cycle. Les données de PCR en temps réel ont été tracées à l'aide du logiciel 7500 Fast System (Applied Biosystems) en prenant la moyenne de trois répliques. La différence relative d'expression a été mesurée en utilisant la méthode  $\Delta\Delta CT$  de base ((Livak et Schmittgen, 2001) (méthode de calcul ci-dessous).

**1 :** Comparaison entre deux conditions expérimentales (condition expérimentale « exp » et condition de contrôle «ctl ») :

Ct	gène-cible	(exp)	–	Ct	gène-cible	(ctl)	= $\Delta$ Ct	<b>gène-cible</b>
Ct	gène-réf	(exp)	–	Ct	gène-réf	(ctl)	= $\Delta$ Ct	<b>gène-réf</b>

**2 :** Normalisation par rapport au gène de référence  
 $\Delta$ Ct gène-cible -  $\Delta$ Ct gène-réf =  $\Delta\Delta$ Ct gène-cible

## 10. Analyse statistique

### 10.1. Calcul de paramètres de maladie permettant la prise en compte de la cinétique d'évolution de symptômes

Le MSS (Maximum Symptom Score) correspond au score de maladie à la fin du suivi des symptômes. Cette durée est de 45 jours après inoculation. Le développement des symptômes après quatre semaines de suivi n'évoluant peu ou pas, aucune correction de données n'a été réalisée afin d'obtenir le MSS.

L'AUDPC Le développement de la maladie est quantifié par l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curves) qui est calculé pour chacune des plantes inoculées en utilisant le package agricolae du logiciel R (The R Project for Statistical Computing, version 4.0.1). Les graphiques ont été tracés grâce aux packages ggplot2.

### 10.2. Plans expérimentaux mis en place et modèles d'analyse statistique associés

#### 10.2.1. Plan en blocs augmentés

Afin d'obtenir deux répétitions biologiques des tests d'antagonisme des consortia bactérien contre *P. medicaginis* et *V.alfalfae*, 15 expériences ont été nécessaires. Un plan d'expérience en bloc augmenté a été mis en place en incluant dans chacune de ces répétitions les souches bactériennes *A. rhizogenes*Arqua1, *E. coli*DH5-alpha, *S. meliloti*RCR2011, *A.tumefaciens*A281 (souches « check »). Les quatre souches « Checks » permettent d'estimer l'effet bloc de chacune des répétitions et de corriger l'ensemble des données.

#### 10.2.2. Plan en parcelles divisées

A l'exception de l'analyse de l'activité d'antagonisme des consortia bactériens de *M.truncatula*, l'ensemble des expériences a été effectué avec un plan en parcelles divisées (Split-plot) avec plusieurs répétitions biologiques (considérées comme effet aléatoire).

### 10.3. Analyse de variance

Des modèles linéaires mixtes ont été mis en œuvre pour les analyses de variance à l'aide des packages lme4 et lmerTest R à l'exception du test d'antagonisme par les consortia bactériens de *M.truncatula* qui a été faite à l'aide du package « augmentedRCBD ».

Les tests de Shapiro (vérification du postulat de normalité des résidus), les tests de Bartlett (vérification du postulat d'homogénéité des variances) ont été réalisés avec le logiciel R. Des comparaisons de moyennes multiples ont été effectuées à l'aide des tests de Dunnett (comparaisons avec le contrôle) ou Tukey (comparaisons par paires) à une valeur  $p \leq 0,05$ .

Les graphiques ont été tracés grâce au package ggplot2 du logiciel R.



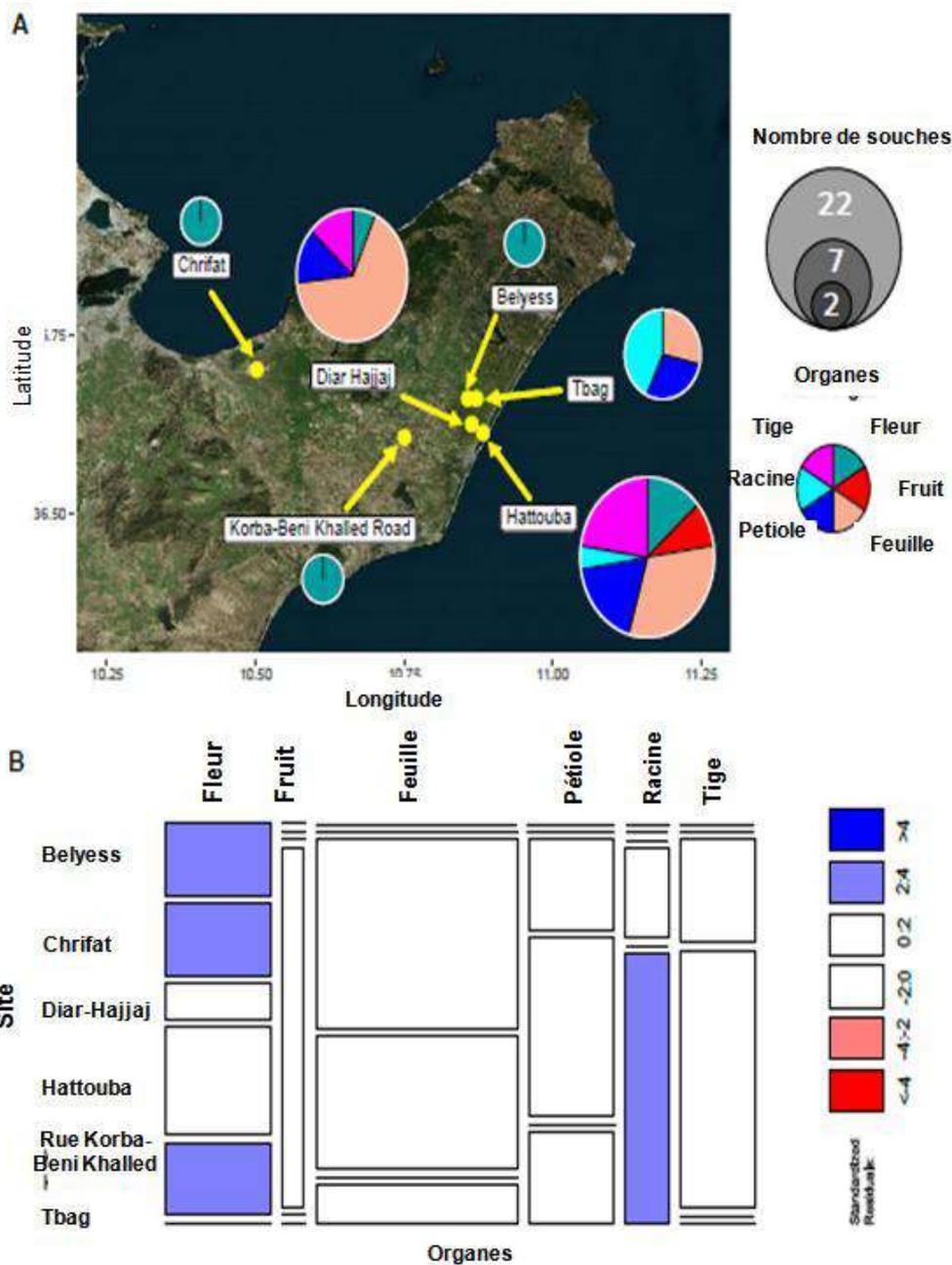
*Analyse des  
Résultats de recherche*

**Chapitre 1 : Etude du pouvoir antifongique et bio-protecteur des bactéries endophytes de *Solanum lycopersicum* L. contre l'agent de la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) en condition de post-récolte**

# **Chapitre 1 : Etude du pouvoir antifongique et bio-protecteur des bactéries endophytes de *Solanum lycopersicum L.* contre l'agent de la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) en condition de post-récolte**

## **1. Caractérisation de la collection de bactéries endophytes de *S.lycopersicum L.***

Cinquante souches de bactéries endophytes ont été isolées à partir de différents organes aériens et racinaires de plantes de tomates saines récoltées dans six sites de la région du Cap Bon en Tunisie (Belyess, Chrifat, Diar Hajjaj, Hattouba, Route Korba-BeniKhaled et Tbag) (Figure 24A, Annexe 1). Toutes les souches isolées se caractérisent par une croissance rapide (<24 h) dont 75% des souches forment de grandes colonies blanches et 25% forment des petites colonies. La collection est significativement enrichie en bactéries de feuilles qui représentent 38% de toutes les souches isolées ( $P < 0,001$ ). En termes d'enrichissement selon le site d'isolement, la localité de Hattouba présente le nombre de souches le plus important avec 22 souches bactériennes endophytes et le plus diversifié en termes d'organe végétal d'origine. La localité Tbag est statistiquement enrichie en bactéries isolées à partir des racines (Figure 24B). Les localités Belyess, Chrifat et Route Korba-BeniKhaled présentent le nombre de souches bactériennes le plus faible avec pour chacune seulement deux souches isolées de fleurs. A une faible échelle géographique (<50km), la présente collection bactérienne montre une large gamme dans l'abondance des communautés endophytes bactériennes et dans leur distribution au sein de la plante selon le site de prospection.



**Figure 24.** Collection de souches bactériennes endophytes isolées de différents organes de plantes de tomates saines. (A) Localisation des sites de collecte dans la région du Cap Bon en Tunisie. Pour chaque site, le camembert représente la proportion relative de souches bactériennes isolées des différents organes des plantes de tomates. La taille du camembert est proportionnelle au nombre de bactéries isolées par site. (B) Diagramme en mosaïque montrant des statistiques d'enrichissement de la collection bactérienne endophyte selon le site de prospection et de l'organe de la plante.

## 2. **Activité antifongique des composés organiques volatils bactériens**

Des tests d'activité antifongique des composés organiques volatils (COV) produits par les souches de bactéries endophytes contre les deux souches de *B. cinerea* S2 et S5 ont été réalisés selon le dispositif en double boîte de Petri. Les résultats ont montré que l'activité antifongique varie selon les souches de bactéries, la souche fongique et le temps d'observation (Figure 25). L'ANOVA sur la base des données de la cinétique de croissance (à 7, 14 et 21 j de co-culture avec les souches bactériennes) et l'aire sous la courbe de progression de la croissance du champignon (AUGPC) a montré un effet significatif de la souche bactérienne, la souche fongique et leur interaction (Tableau 15 ; Figure 25B).

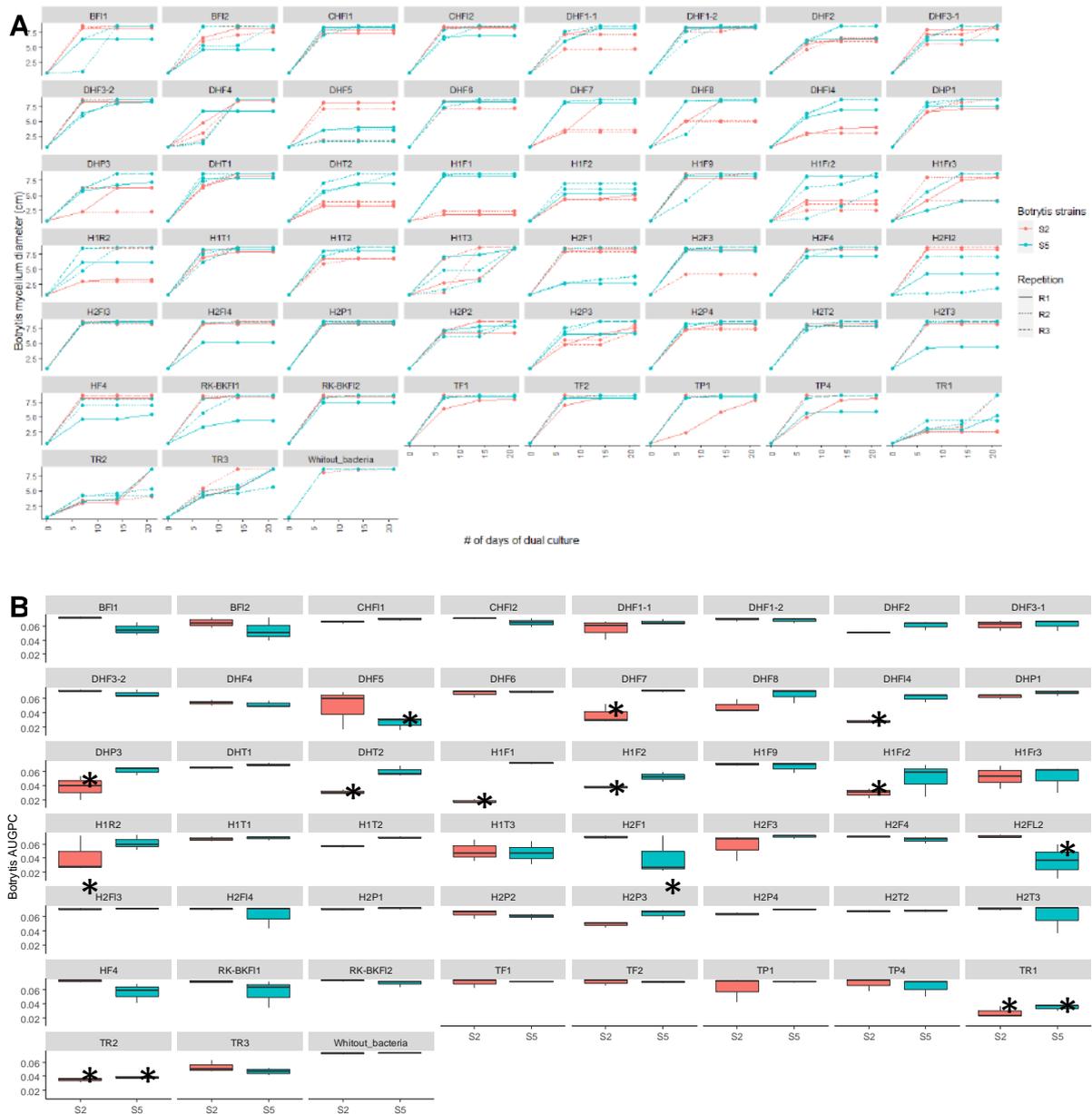
Dix-huit souches de bactéries (soit 36% de la collection) ont montré un effet antagoniste contre *B. cinerea* (Tableau 16). Ces bactéries antagonistes ont été isolées des localités de Diar Hajjaj, Hattouba et Tbag. Trois comportements antagonistes ont été notés (i) huit souches (soit 62% des souches bactériennes antagonistes) inhibaient spécifiquement la souche *B. cinerea* S2, les souches DHT2, H1Fr2, DHF14 et H1F1 présentant les effets antagonistes les plus forts; (ii) trois souches, à savoir DHF5, H2F12 et H2F1, ont spécifiquement réduit la croissance des mycéliums de la souche S5 de *B. cinerea*; (iii) deux souches, à savoir TR1 et TR2, ont inhibé de manière significative la croissance mycélienne des deux souches fongiques (Figure 25B). Après 21 jours de co-culture, la croissance de la souche S2 a été réduite de 76,7% par les COV bactériens produits par la souche H1F1 et la croissance de la souche S5 a été réduite de 64,5% par les COVs de la souche bactérienne DHF5.

**Tableau 15.** Analyse de la variance de type III de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* sous l'influence de composés organiques volatils produits par les bactéries endophytes.

L'analyse a été réalisée sur la base de la cinétique de croissance fongique (à 7, 14 et 21 jours de co-culture avec des bactéries endophytes) et l'aire sous la courbe de progression de croissance du champignon (AUGPC). Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où les bactéries endophytes, la souche *Botrytis* et leur interaction ont été considérées comme des effets fixes. L'expérience indépendante a été traitée comme un effet aléatoire.

Codes de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1.

Source de variation	df	7 j		14 j		21 j		AUGPC	
		F value	Pr(>F)						
Souche bactérienne	50	6.8940	9.417e-15 ***	6.9942	4.022e-15 ***	4.4705	6.308e-09 ***	7.4125	5.675e-16 ***
Souche de Botrytis	1	1.2470	0.2655	11.6370	0.0007872 ***	11.6780	0.0007727 ***	7.8017	0.005745 **
Souche bactérienne * Souche de Botrytis	50	3.0742	1.631e-08 ***	3.8637	8.072e-12 ***	3.7161	3.647e-11 ***	4.2633	1.909e-13 ***



**Figure 25.** Évaluation de l'activité antifongique *invitro* des composés organiques volatils (COV) des bactéries endophytes. (A) Cinétique de croissance des mycéliofongiques des souches S2 et S5 de *Botrytis cinerea* soumises à des COVs bactériens dans le système en double boîtes. Trois répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque combinaison de souches de bactérie-champignon. (B) Aire sous la courbe de progression de la croissance (AUGPC) des souches de *Botrytis cinerea* S2 et S5 soumises à des COV bactériens en double culture. Pour l'AUGPC, une valeur faible indique une activité antifongique élevée des souches bactériennes. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au traitement contrôle «Sans-Bactéries» indiqué par le test de Dunnett (\* P <0,05).

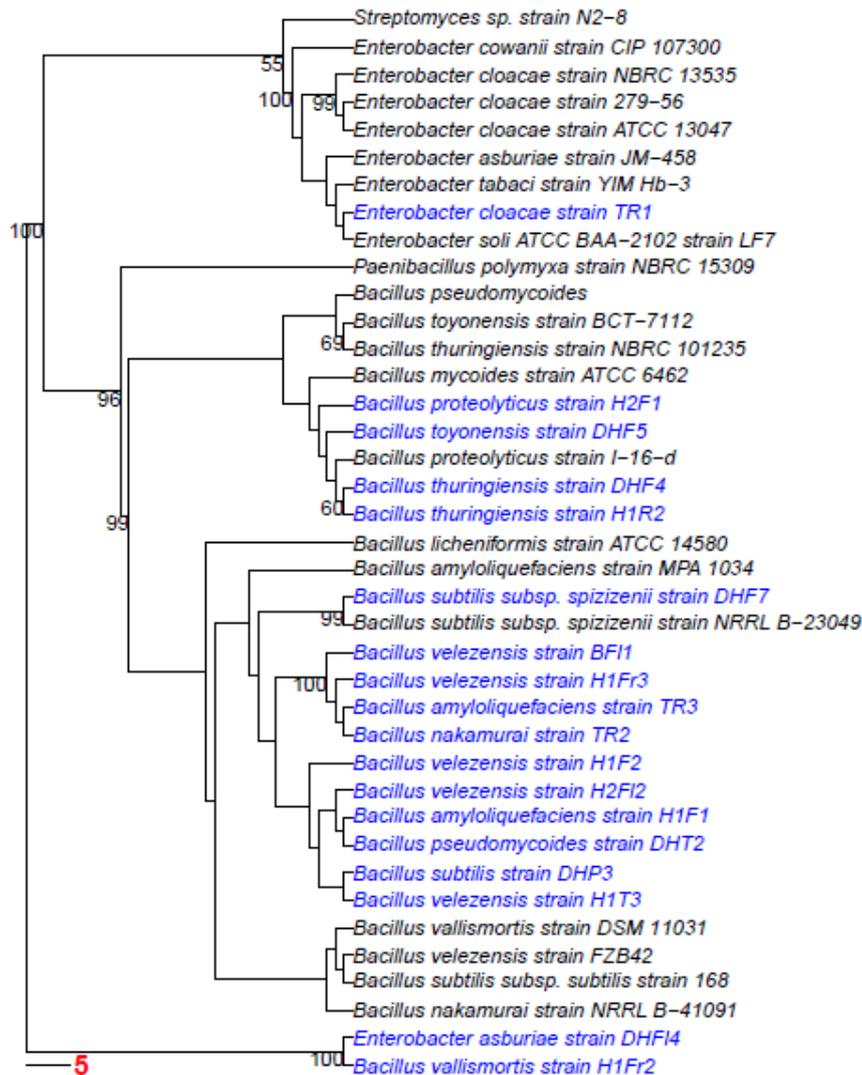
Les souches bactériennes antagonistes ont également été sélectionnées en fonction de la persistance de leur activité pendant 21 jours de confrontation (Tableau 15). Douze souches ont maintenu une activité antagoniste significative contre la croissance des mycéliums de *B. cinerea* jusqu'à 21 jours de co-culture, avec respectivement neuf et trois souches contre les souches de *Botrytis* S2 et S5 (Tableau 16). Cinq souches ont été caractérisées par une activité antifongique temporaire qui diminue après 7 jours de co-culture (par exemple, TR3, BF11 et H1Fr3 contre S5 ou H1T3 et DHF4 contre les souches S2 et S5). Certaines souches ont eu une persistance intermédiaire de leurs activités, par exemple, l'activité de la souche TR2 contre les deux souches de *Botrytis* a diminué après 14 jours. L'activité de la souche TR1 contre la souche S5 de *Botrytis* a diminué après 14 jours mais elle a été maintenue contre la souche S2 de *Botrytis* jusqu'à 21 jours de confrontation.

**Tableau 16.** Cinétique et persistance de l'activité antifongique des composés organiques volatils (COV) des bactéries endophytes contre les souches S2 et S5 de *Botrytis cinerea*.

Seules les souches de bactéries endophytes produisant des COV antifongiques sont présentées ici. Les couleurs orange foncé et bleu foncé dans AUGPC et la cinétique de croissance des mycéliums fongiques à 7, 14 et 21 jours indiquent des différences significatives par rapport au traitement contrôle « sans bactéries » en utilisant le test de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). Les couleurs orange clair et bleu clair indiquent des différences peu significatives en utilisant le test de Dunnett ( $P \leq 0,1$ ). La couleur blanche indique l'absence d'activité antifongique significative par rapport au traitement « sans bactérie ». Les espèces bactériennes ont été identifiées sur la base des séquences génétiques de l'ARNr 16S et de la recherche d'homologie dans la base de données Genbank. Les souches de bactéries en gras ont été sélectionnées sur la base de leurs activités antifongiques élevées et persistantes contre une seule souche ou les deux souches de *B. cinerea*.

Souche ID	Espèces bactériennes	Activité antifongique Contre la souche S2				Activité antifongique contre la souche S5			
		AUGPC	7 j	14 j	21 j	AUGPC	7 j	14 j	21 j
<b>H1F1</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>								
DHF14	<i>Enterobacter asburiae</i>								
H1Fr2	<i>Bacillus vallismortis</i>								
<b>DHT2</b>	<i>Bacillus pseudomycooides</i>								
DHF7	<i>Bacillus subtilis subsp.spizezenii</i>								
H1F2	<i>Bacillus velezensis</i>								
H1R2	<i>Bacillus thuringiensis</i>								
DHF5	<i>Bacillus toyonensis</i>								
<b>H2F12</b>	<i>Bacillus velezensis</i>								
H2F1	<i>Bacillus proteolyticus</i>								
<b>TR1</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>								
TR2	<i>Bacillus nakamurai</i>								
H1T3	<i>Bacillus velezensis</i>								
TR3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>								
DHF4	<i>Bacillus thuringiensis</i>								
BF11	<i>Bacillus velezensis</i>								
H1Fr3	<i>Bacillus velezensis</i>								

L'identification moléculaire sur la base des séquences du gène de l'ARNr 16S des 18 souches de bactéries endophytes antagonistes (numéros d'accèsion de MN080812.1 à MN080816.1 et de MN737985.1 à MN737997.1) (Figure 26) a montré un enrichissement statistique en bactéries du genre *Bacillus* (Annexe 7, Monte Carlo a simulé la valeur P de  $\text{Khi}^2 = 0,0015$ ). En effet, 16 souches (soit 89%) appartiennent à neuf espèces de *Bacillus* dont cinq souches de *B. velezensis* (pas d'enrichissement statistiquement significatif). Les deux souches restantes appartiennent à différentes espèces du genre *Enterobacter*. Aucune association statistique entre les espèces bactériennes endophytes et leur effet antifongique sur les souches S2 ou S5 de *B. cinerea* a été observée selon le test d'indépendance  $\text{Khi}^2$ . Cela suggère qu'aucune espèce bactérienne endophyte ne protège spécifiquement contre une souche spécifique de *Botrytis cinerea*. De même, aucun enrichissement significatif du site ou de l'organe d'origine avec des souches bactériennes antagonistes a été observé.



**Figure 26.** Arbre phylogénétique (Neighbor joining) de 18 souches de bactéries endophytes isolées de tomate avec une activité antifongique contre *Botrytis cinerea* (en bleu) et souches de bactéries de référence basées sur l'alignement des séquences nucléotidiques du gène de l'ARNr 16S. Des valeurs bootstrap supérieures à 50% sont indiquées dans cet arbre.

### 3. Effet des composés organiques volatils bactériens sur la germination des graines de tomates et la croissance des plantules

Les souches de bactéries endophytes ont été criblées *invitro* quant à leur activité de COV sur la germination des graines de tomates et la croissance des plantules. Les paramètres étudiés relatifs à la germination des graines et à la croissance des plantules (longueur et poids frais et sec) ont été significativement affectés par les COV bactériens après 6 jours de double culture (valeur  $P < 0,05$ , Tableaux 17 et 18). Trois comportements ont été observés en fonction de la souche bactérienne et du paramètre mesuré. Selon le paramètre mesuré, entre 66% et

94% des souches bactériennes produisaient des COV avec un effet neutre sur le développement des plantes (Figure 27). Un comportement promoteur des COVs a été noté pour 2% à 8% des souches bactériennes selon le paramètre mesuré; en effet, quatre souches (RK-BK F11, DHF14, H2F3 et H1F9) ont amélioré le poids frais des plantules, deux souches (DHF6 et H2F13) ont augmenté leur longueur et une souche (H2T2) a amélioré le poids sec des plantules par rapport aux plantules témoins en présence de Milieu LB (Figure 27). Cependant, aucune souche bactérienne a montré d'effet promoteur significatif sur le taux de germination des graines (Figure 27). Certaines souches de bactéries ont montré un effet délétère sur le développement des plantules en fonction du paramètre mesuré, 22% des bactéries endophytes ont réduit la germination des graines, 26% ont réduit le poids frais des plantules et 6% ont réduit leur poids sec (Figure 27). L'effet des COV bactériens dépend du paramètre mesuré. Par exemple, DHF6 et H2F13 augmentent la longueur des plantules mais pas les poids frais et secs de celles-ci. Certains COV bactériens ont amélioré la croissance des plantules mais n'ont aucun effet (par exemple DHF6, H1F9 ou H2T2) ou même ont inhibé la germination des graines (par exemple H2F13) (Figure 27). Enfin, certaines souches de bactéries telles que H2F1 ont produit des COV qui inhibent la germination des graines et la croissance des plantules (Figure 27).

**Tableau 17.** Analyse de la variance de type III de la croissance des plantules sous l'influence de composés organiques volatils bactériens endophytes.

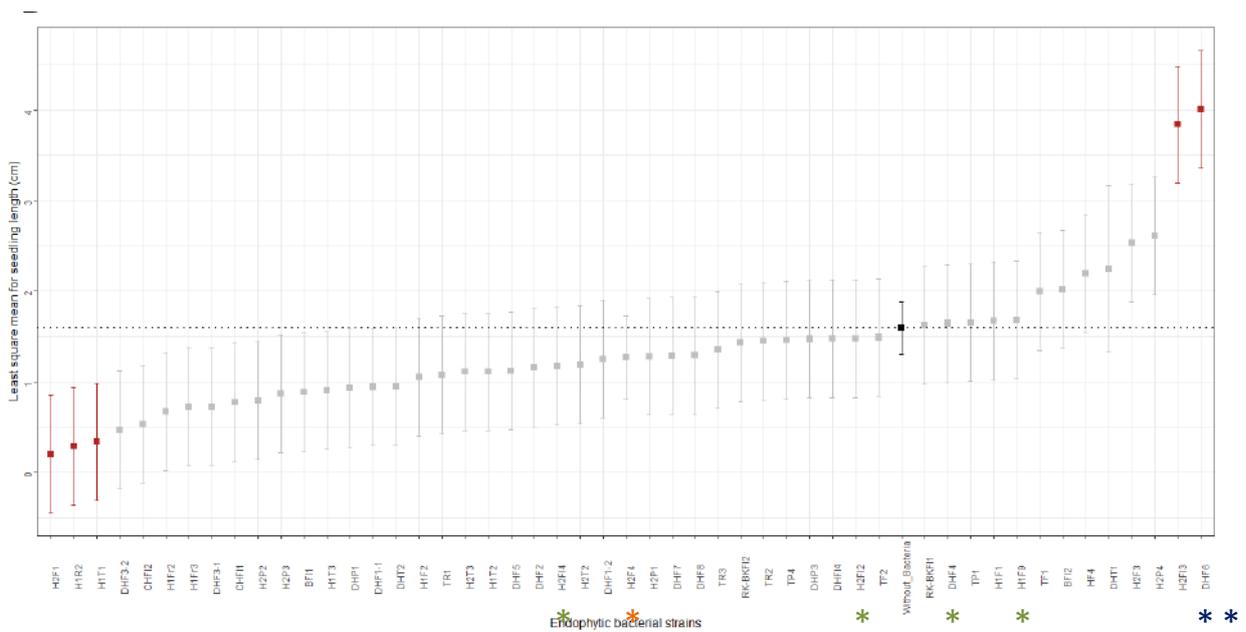
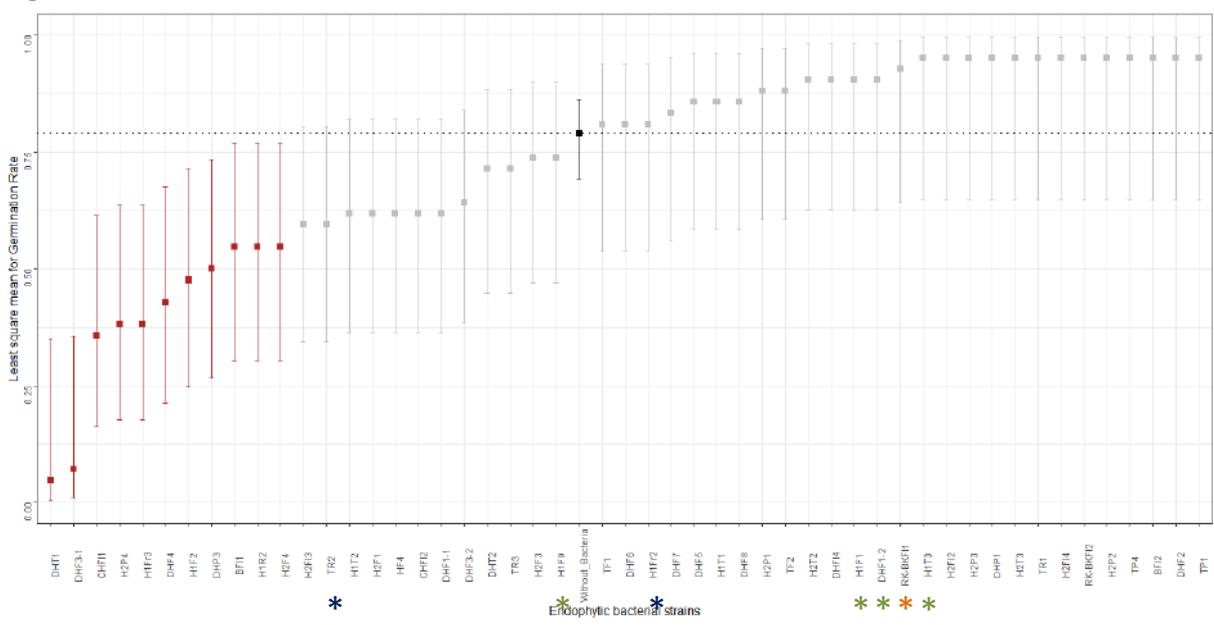
Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où les bactéries endophytes ont été considérées comme des effets fixes et une expérience indépendante était considérée comme un effet aléatoire. Afin de normaliser les résidus de MLM, des transformations log10 (poids frais) et log10 (poids sec) ont été utilisées. Codes de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '' 1.

Source de variation	df	Longueur des semis		Poids frais		Poids sec	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Souche bactérienne	50	5.2195	1.676e-09 ****	19.884	< 2.2e-16 ***	2.1235	0.006331 **

**Tableau 18.** Analyse de la variance de type III de la germination des graines de tomate sous l'influence de composés organiques volatils bactériens endophytes.

Les données ont été analysées avec un modèle mixte linéaire généralisé où les bactéries endophytes ont été considérées comme des effets fixes et une expérience indépendante considérée comme un effet aléatoire. Le LRT (test du rapport de vraisemblance) et la valeur P comparant le modèle avec ou sans facteur fixe sont rapportés. Codes de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '' 1.

Source de variation	df	Pourcentage de germination	
		LRT	Pr(Chi)
Souche bactérienne	50	324.44	< 2.2e-16 ***



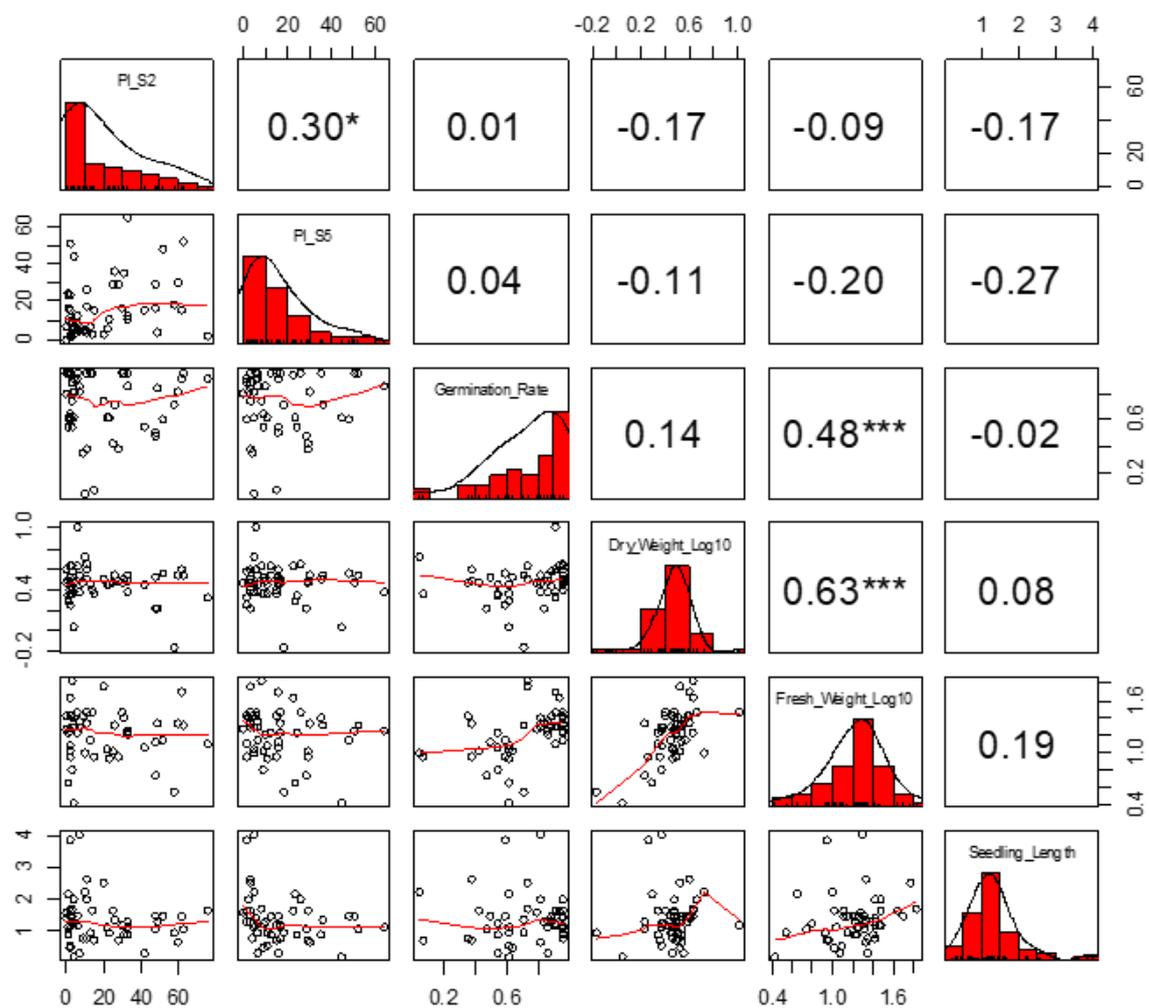


vertes et oranges représentent respectivement des souches bactériennes ayant des effets promoteurs significatifs sur la longueur et les poids frais et secs des plantules.

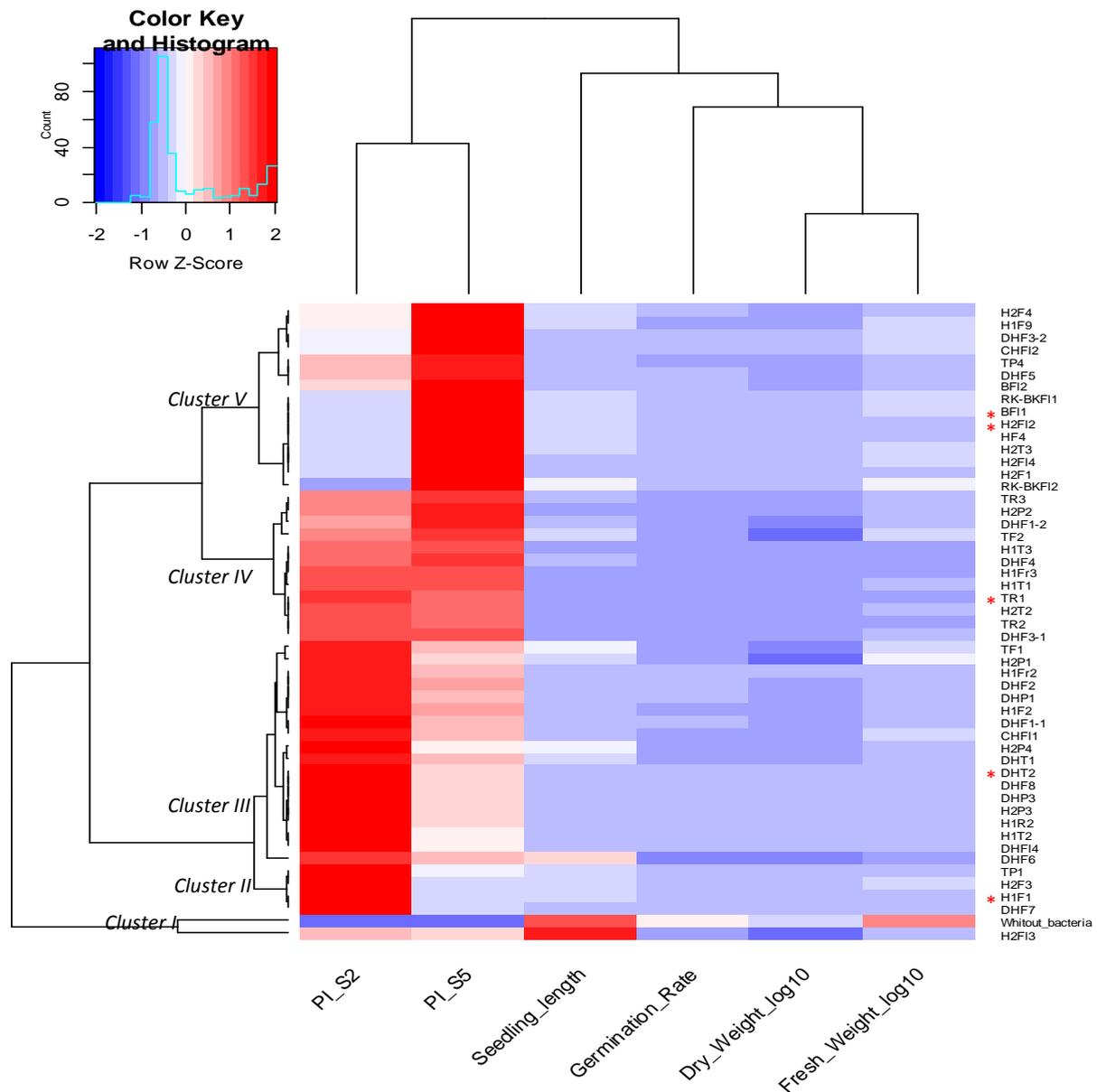
#### **4. Corrélation entre les activités antifongiques et de croissance des plantes des composés organiques volatils bactériens et regroupement des souches**

Parmi les 16 corrélations possibles entre les paramètres mesurés liés aux activités antifongiques des COVs et de leur action sur la croissance des plantes, trois étaient statistiquement significatives (Figure 28). Une corrélation positive significative a été observée entre le poids frais et sec des plantules de tomates et entre la germination et le poids frais des plantules. Une corrélation significative et positive a été observée entre les activités antifongiques contre les deux souches de *Botrytis* S2 et S5 (Figure 28). Aucune corrélation significative a été observée entre les paramètres liés aux activités antifongiques et de croissance des plantes des COVs bactériens.

Le regroupement des souches endophytes en fonction de leurs activités antifongiques et de leur effet sur la croissance des plantes de tomates *via* les COVs a montré cinq groupes de bactéries (Figure 29). Le cluster I contient une souche de bactérie, H2F13, avec une activité de COV assez similaire au milieu LB sans bactérie; le cluster II contient 4 souches à fort effet antifongique contre la souche S2 de *B. cinerea* uniquement alors que le cluster III contient 18 souches à fort effet antifongique contre la souche S2 de *B. cinerea* et une activité faible (non significative) contre la souche S5 de *B. cinerea*. Le cluster IV contient 12 souches de bactéries ayant des COVs à activité antifongique contre les deux souches de *B. cinerea*. Le cluster V contient 15 souches ayant une activité antifongique spécifique contre la souche S5 de *B. cinerea*.



**Figure 28.** Corrélations entre les paramètres relatifs à l'activité antifongique et à effet sur la croissance des plantules des COVs des bactéries endophytes. Les corrélations par paires ont été calculées sur la base des moyennes d'analyses MLM et GLMM. Pour chaque souche endophyte, le pourcentage d'inhibition de la croissance des mycéliums de *Botrytis cinerea* de la souche S2 (PI\_S2) et de la souche S5 (PI\_S5) a été calculé sur la base des valeurs « lsmeans » d'AUGPC rapportées à la valeur du traitement contrôle « sans bactéries ». Les coefficients de corrélation de Pearson par paires sont indiqués. Les astérisques représentent des corrélations significatives selon le code de signification suivant pour les valeurs P: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '' 1. Le graphique a été obtenu à l'aide du package psych du logiciel R.



**Figure 29.** Regroupement des bactéries endophytes (Heatmap) en fonction de l'activité antifongique et de l'effet sur la croissance des plantules de leurs COVs. Le regroupement hiérarchique des souches bactériennes a été calculé sur la base des corrélations de Pearson. Les scores Z ont été calculés et utilisés pour générer la Heatmap. La couleur rouge indique une activité élevée et la couleur bleue indique une faible activité. Le dendrogramme à gauche montre les souches de bactéries se regroupant en fonction de leurs activités biologiques (cinq groupes bactériens de I à V). Les étoiles rouges indiquent les cinq souches de bactéries endophytes qui ont été sélectionnées pour des analyses plus approfondies. Le graphique a été obtenu en utilisant la fonction heatmap.2 du package gplot du logiciel R.

## **5. Caractérisation des souches des bactéries endophytes sélectionnées pour lutter contre *Botrytis cinerea***

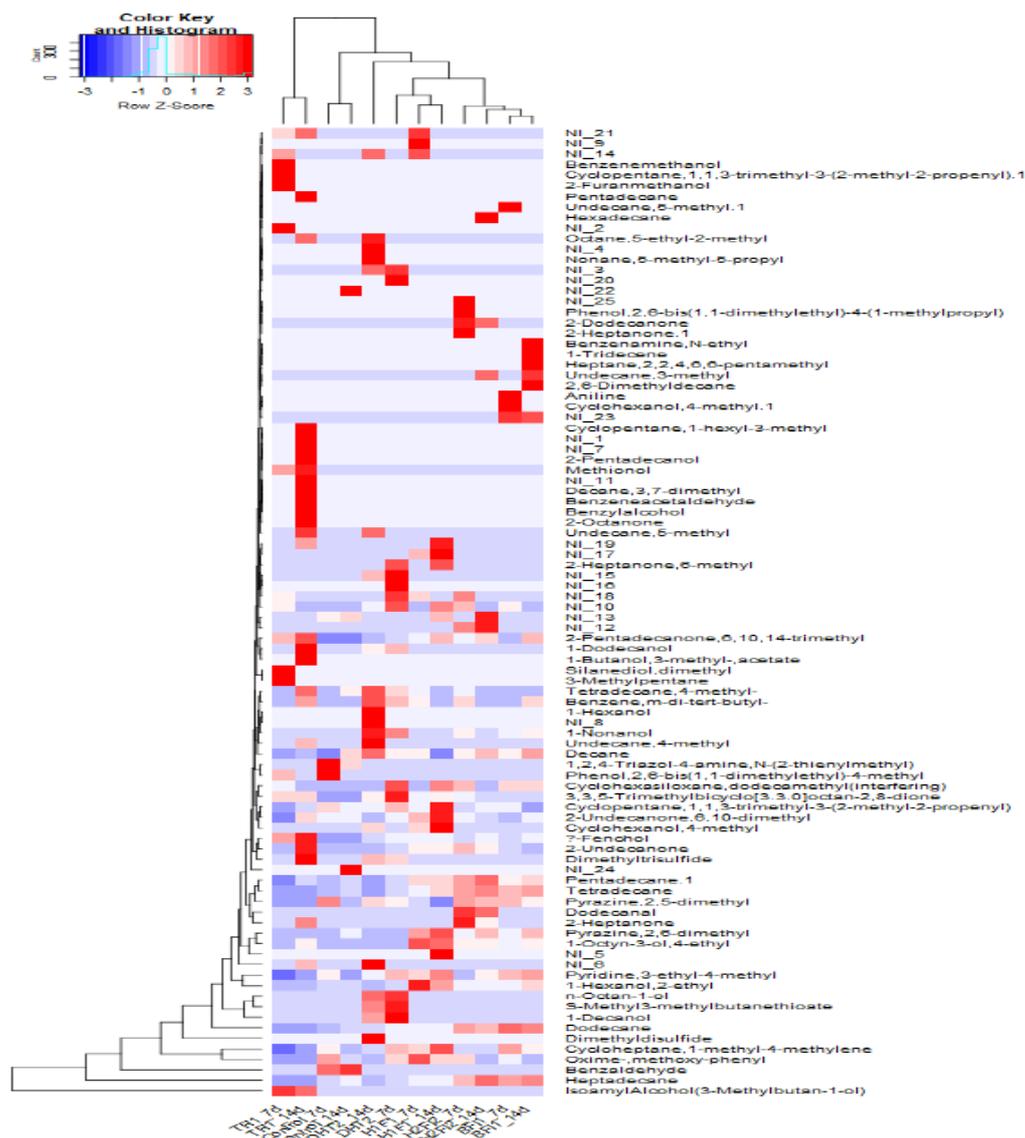
### **5.1. Sélection des souches des bactéries endophytes**

Sur la base du regroupement de bactéries endophytes, cinq souches appartenant aux clusters II, III, IV et V de bactéries produisant des COV avec de fortes activités antifongiques et, dans la mesure du possible, ayant des effets neutres à positifs sur la germination des graines et la croissance des plantules de tomates ont été sélectionnées pour d'autres études (Figure 27). Le séquençage du gène de l'ARNr 16S de ces souches de bactéries endophytes a montré qu'elles appartiennent aux espèces suivantes: *Bacillus amyloliquefaciens* H1F1 (Cluster II), *Bacillus pseudomycoïdes* DHT2 (Cluster III), *Enterobacter cloacae* TR1 (Cluster IV) et *Bacillus velezensis* H2F12(Cluster IV) et BF11 (Cluster V).

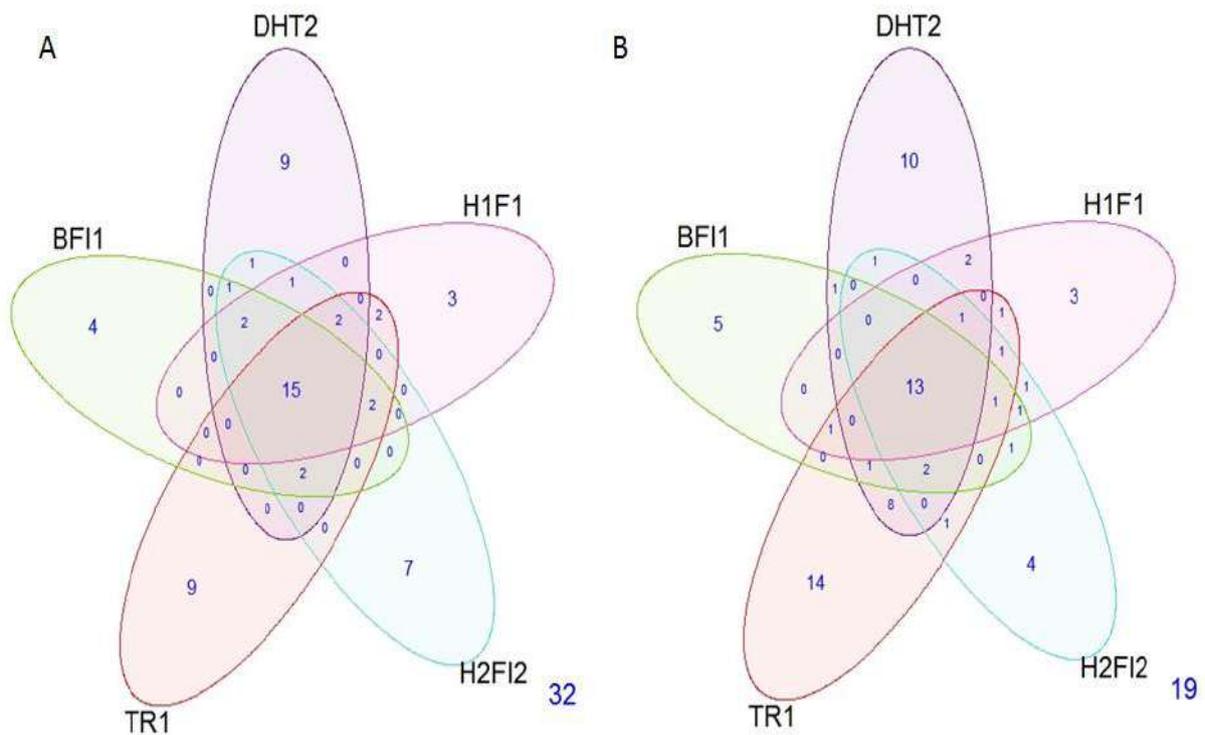
### **5.2. Identification des composés organiques volatils produits par les souches des bactéries endophytes sélectionnées**

Les composés organiques volatils produits par les cinq souches bactériennes endophytes ainsi que ceux du milieu témoin LB solide ont été caractérisés par SPME-GC / MS à 7 et 14 jours de culture (Annexe 9). La comparaison globale des profils de COV des bactéries endophytes a montré une nette différence entre eux et en fonction du temps de culture pour la même souche (Figure 30 et 31). Au total, 93 composés organiques volatils ont été détectés avec 68 composés (soit 73%) d'identité connue (Annexe 9). Vingt COVs communs ont été produits par les cinq souches, dont sept composés non détectés dans le milieu LB Agar de bactéries ; six composés identifiés (1-octyn-3-ol, 4-éthyl;  $\beta$ -fenchol; Benzène, m-di-tert-butyle, 2-undécane, 3,3,5-triméthylbicyclo [3.3.0] octan-2,8-dione, 2-pentadécane, 6,10,14-triméthyl) et un composé non identifié (NI). Ces molécules peuvent constituer un ensemble de base de COV produits par les bactéries endophytes de la tomate, quelle que soit l'espèce bactérienne. Quarante-six COV spécifiques à la souche bactérienne (soit 47,31%) ont été enregistrés, avec une grande majorité (37/46 soit 80,4%) produits à un moment de culture spécifique à 7 ou 14 jours. Les deux souches de *B. velezensis* BF11 et H2F12 du groupe V qui réduisaient spécifiquement la croissance des mycéliade la souche S5 de *B. cinerea* présentent les profils de COVs les plus similaires (Figure 29) avec le Undécane, 3-méthyl comme volatil commun et spécifique à ces deux souches. BF11 a produit au total 31 COVs avec six composés spécifiques à la souche avec la benzénamine, N-éthyle comme composé spécifique représentant 0,74% de son total des COVs produits (Annexe 8). La souche H2F12 a produit au total 36 COVs dont sept sont spécifiques avec le Dodécane comme composé principal

représentant respectivement 4,61% et 5,54% de tous les composés volatils produits à 7 et 14 jours de culture. La souche DHT2 a produit au total 43 COVs dont 10 sont spécifiques à la souche, le disulfure de diméthyle étant le principal composé représentant 37,19% de ses COV totaux. La souche H1F1 a produit au total 32 COVs dont trois sont des composés spécifiques avec un composé majeur inconnu représentant 8,35% de ses COVs (Annexe 9). La souche TR1 a montré le profil de COVs le plus distinct par rapport aux autres souches de bactéries (Figure 30). En effet, cette souche a produit au total 53 composés dont 18 sont spécifiques à la souche (soit 33,96% des COVs détectés) avec l'alcool isoamylique (3-méthylbutan-1-ol) qui est le composé majeur représentant 80,91% et 58,80% de sa production de COVs à 7 et 14 jours de culture, respectivement (Annexe 9).



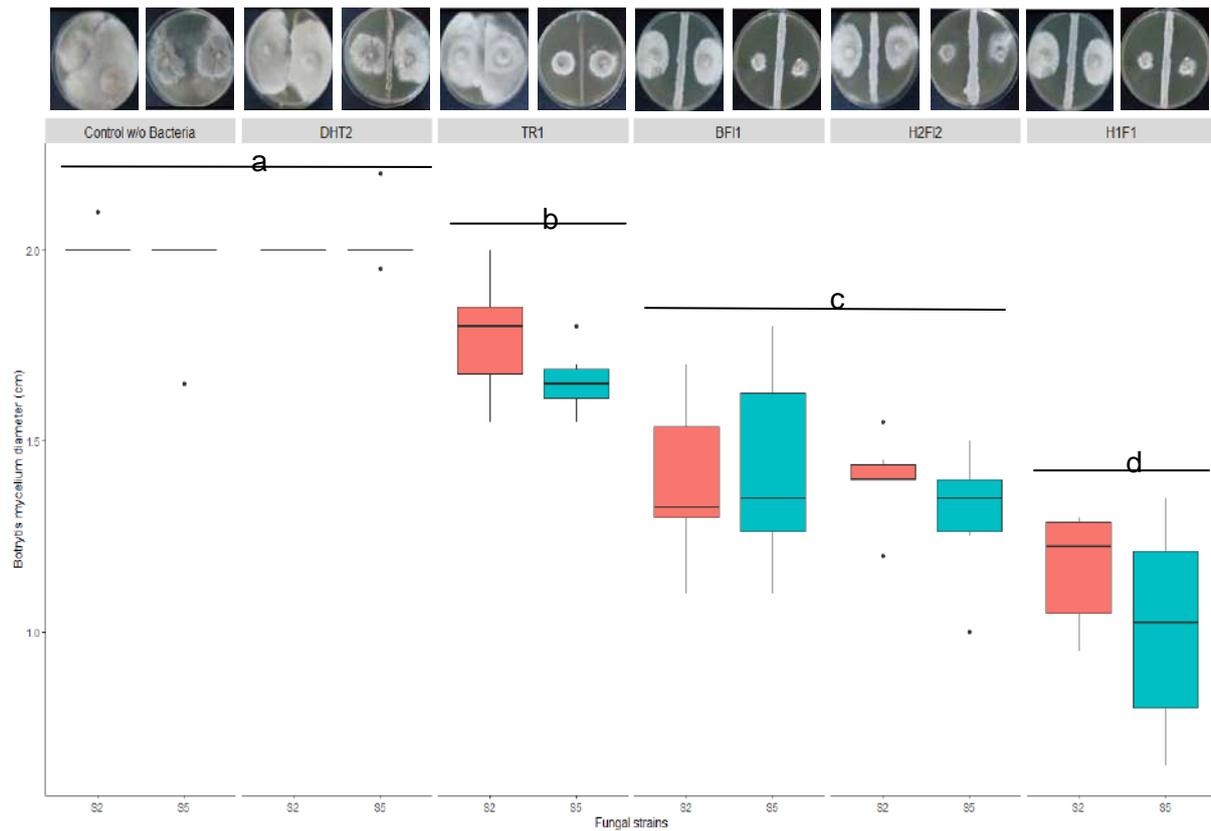
**Figure 30.** Regroupement des cinq souches de bactéries endophytes (BF11, DHT2, H1F1, H2F12 et TR1) en fonction de leurs profils de production des composés volatils détectés par la technique SPME-GC / MS. Les COVs ont été mesurés à 7 et 14 jours de culture bactérienne sur milieu LB Agar (le milieu LB sans bactéries a été utilisé comme condition témoin) dans deux répétitions indépendants. Les moyennes des pourcentages de molécules pour les deux répétitions ont été utilisés pour calculer les scores Z afin de générer la Heatmap. La matrice de données a été normalisée par ligne pour absorber la variation entre les molécules des COVs. Le dendrogramme à gauche montre les relations entre les quantités de 92 COVs émis selon les différents échantillons (souches bactériennes et âge de culture). Le dendrogramme supérieur montre les relations entre les échantillons en fonction de leurs profils des COVs. La couleur bleue indique une concentration élevée et la couleur rouge indique une faible concentration de COV. NI\_ #: Composé non identifié.



**Figure 31.** Diagramme de Venn montrant le nombre des COVs communs produits par 5 souches bactériennes endophytes. L'analyse a été faite sur la base des pourcentages de détection des COV à 7 et 14 jours. Le Diagramme de Venn a été généré par la fonction vennDiagram du package limma du logiciel R.

### 5.3. Caractérisation de l'activité des composés solubles sécrétés par les bactéries endophytes sélectionnées

La capacité de souches bactériennes sélectionnées à produire des composés antifongiques solubles a été évaluée par co-culture des bactéries avec les souches S2 et S5 de *B. cinerea* sur le milieu PDA (Figure 32). À l'exception de la souche DHT2, les souches bactériennes sélectionnées ont inhibé significativement à différents degrés la croissance de *B. cinerea* sur milieu PDA à 7 jours de co-culture (Figure 32, test de Tukey  $P < 0,01$ ). Aucun effet significatif d'interaction entre les souches bactériennes et les souches fongiques n'a été observé (Tableau 19). La souche H1F1 a produit les composés solubles antifongiques les plus efficaces contre *B. cinerea*, suivie des souches BF11, H2F12 et TR1 (Figure 32).



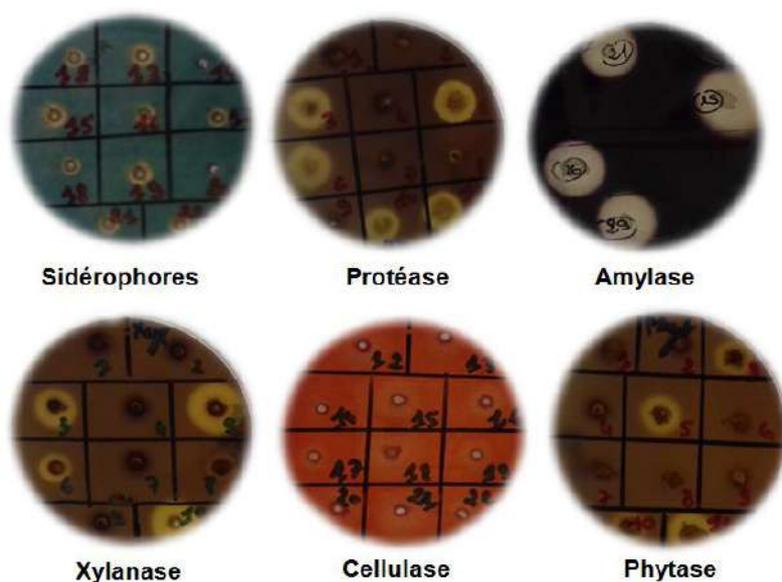
**Figure 32.** Activité antifongique *invitro* des composés solubles produits par cinq souches de bactéries (BF11, DHT2, H1F1, H2F12 et TR1) contre les souches S2 et S5 de *B. cinerea*. L'activité antifongique a été évaluée comme la diminution de la croissance des mycéliums fongiques par rapport à la condition témoin «sans bactéries» sur milieu PDA à 7 jours de co-culture. Une boîte représentative de l'activité antifongique des bactéries à 7 jours est présentée pour chaque combinaison de souches bactérie/champignon. Deux répétitions indépendantes avec trois boîtes pour chaque combinaison de souches bactérie/champignon ont été réalisées. Les lettres indiquent des groupes significativement différents selon le test de Tukey pour des comparaisons moyennes multiples à \*\*  $P < 0,01$ .

**Tableau 19.** Analyse de la variance de type III de la croissance des mycéliade *Botrytis cinerea* en présence des composés solubles des souches bactériennes endophytes solubles à 7 jours de co-culture.

Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où les bactéries endophytes et les souches de *B. cinerea* et leur interaction ont été considérées comme des effets fixes et la répétition de l'expérience a été considérée comme un effet aléatoire. Codes de signification pour les valeurs p: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.'1.

Source de variation	df	Croissance fongique	
		F value	Pr(>F)
Souche bactérienne	5	60.2059	<2e-16 ***
Souche de Botrytis	1	2.6826	0.1067
Souche bactérienne * Souche de Botrytis	5	0.6562	0.6580

Les activités antimicrobiennes (enzymes hydrolytiques et cyanure d'hydrogène HCN) et les activités de promotion de la croissance des plantes (solubilisation des phosphates, sidérophores et production d'ammoniac) des bactéries endophytes sélectionnées ont été étudiées *in vitro* en utilisant des milieux spécifiques. Les résultats ont montré qu'à l'exception de la souche TR1 (qui ne produisait que 1 sur 7 enzymes hydrolytiques), les quatre souches de bactéries endophytes (BF11, DHT2, H1F1 et H2F12) produisent la plupart des enzymes étudiées (6 sur 7 enzymes hydrolytiques) et possèdent au moins 2 activités PGP (Plant Growth Promoting) sur 3 (Tableau 20 ; Figure 33). Aucune souche de bactéries endophytes sélectionnée ne produit de HCN (Tableau 20).



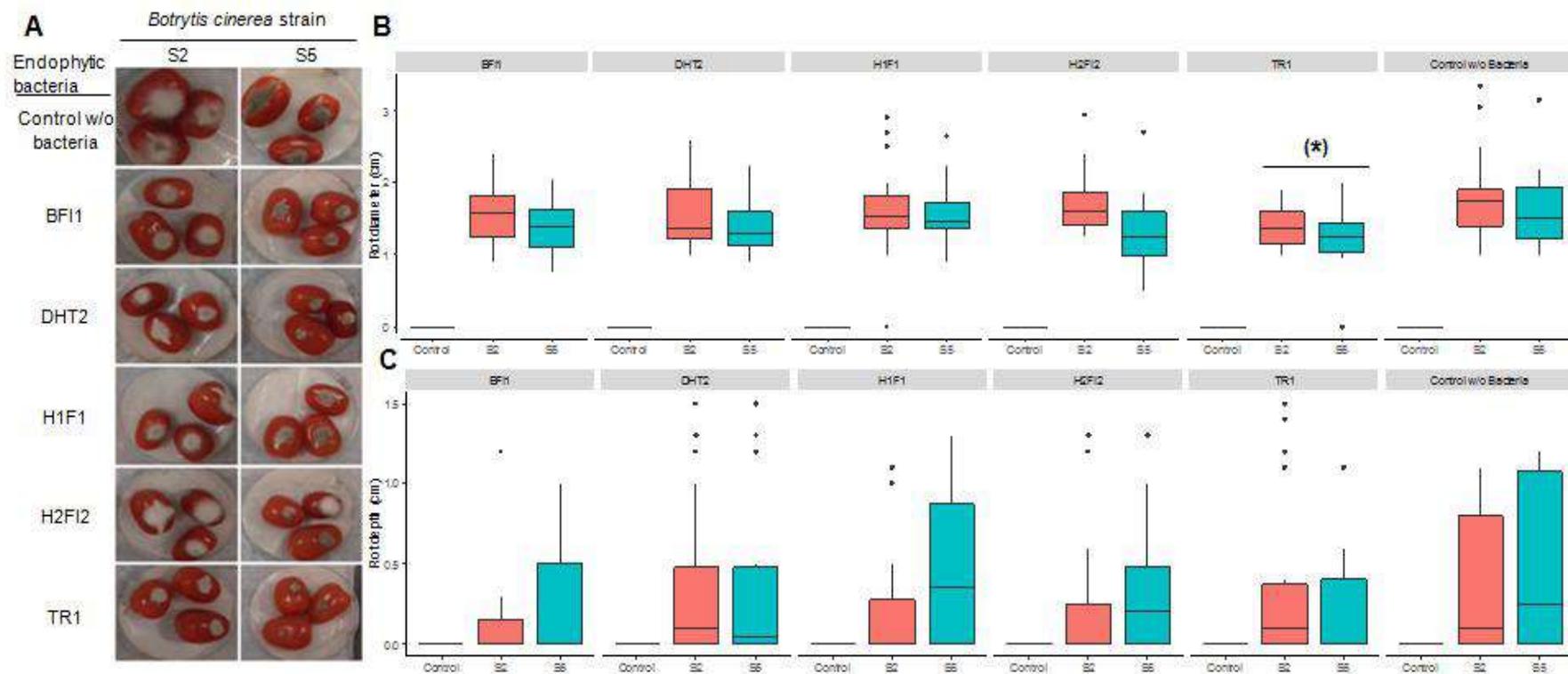
**Figure 33.** Illustration de la capacité des bactéries endophytes à produire des enzymes hydrolytiques et de sidérophores.

**Tableau 20.** Activités enzymatiques et de promotion de la croissance des plantes des souches de bactéries endophytes.

Souches bactériennes	Activité antimicrobienne								Activité de promotion de croissance		
	Cellulase	Pectinase	Amylase	Phytase	Xylanase	Protéase	Chitinase	Production de HCN	Solubilisation de phosphate	Production de sidérophore	Production d'Ammoniac
<b>BF11</b>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<b>DHT2</b>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<b>H1F1</b>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<b>H2F12</b>	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<b>TR1</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## **6. Contrôle biologique de *B. cinerea* sur les fruits de tomate par les COVs et les cellules végétatives des bactéries endophytes**

L'évaluation de la capacité de bio-protection des souches de bactéries endophytes sélectionnées contre *B. cinerea* sur fruit de tomate a été réalisée par deux tests utilisant les COVs des cinq souches bactériennes. L'analyse de la variance des données du test de bio-protection en utilisant les COV bactériens a montré un effet sub-significatif des souches bactériennes sur le diamètre de pourriture (valeur  $p = 0,09$ ) et aucun effet significatif sur la profondeur de la pourriture de *B. cinerea* à 6 j après infection (Tableau 21). Seuls les COVs de la souche TR1 ont réduit de manière significative le diamètre de pourriture de *B. cinerea* sur les fruits de tomate infectés par les deux souches fongiques S2 et S5 (Figure 34).



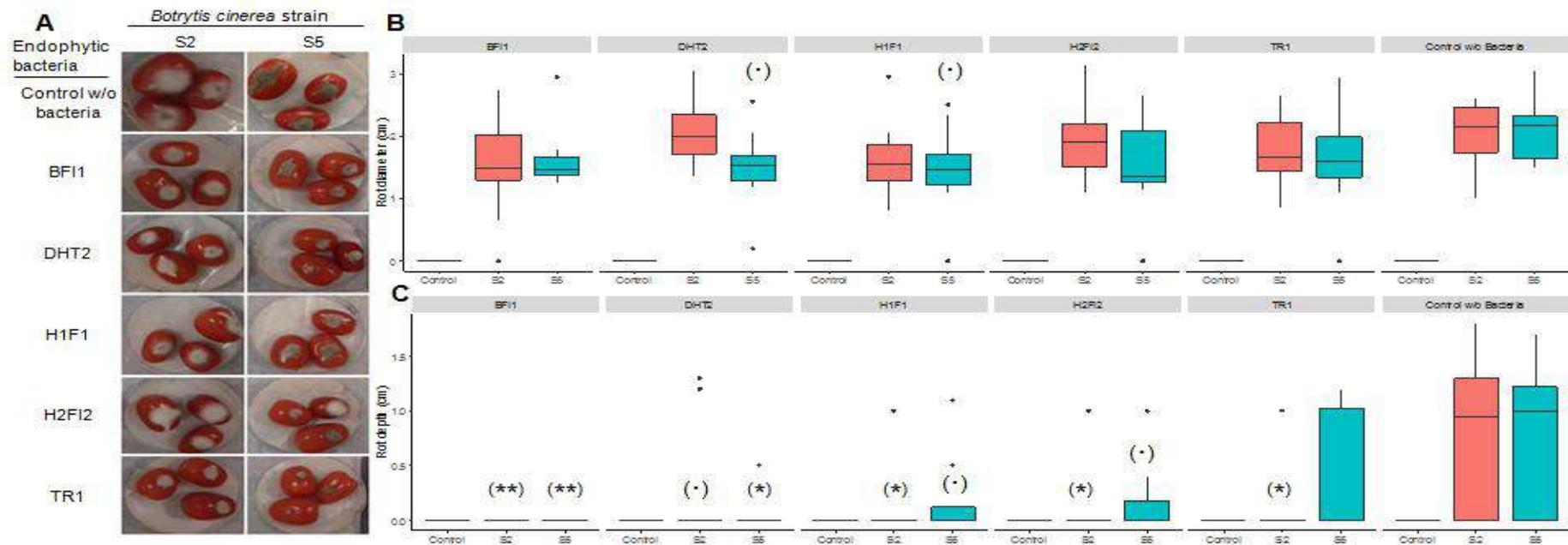
**Figure 34.** Effet des composés organiques volatils (COV) de cinq souches de bactéries endophytes sur l'infection à *Botrytis cinerea* sur les fruits de tomate. (A) Photos de fruits de tomates exposés ou non à des COV bactériens endophytes (sans bactéries) à 6 jours après infection par des souches de *B. cinerea* S2 ou S5. Les boîtes à moustaches représentent le diamètre (B) et la profondeur (C) de la pourriture des fruits causée par les souches S2 et S5 de *B. cinerea* ou la condition témoin non infectée. Les étoiles entre parenthèses indiquent une différence significative par rapport au traitement «sans bactérie» comme indiqué par le test de Dunnett (\* P <0,05). L'expérience a été répétée trois fois indépendamment.

**Tableau 21.** Analyse de la variance de type III de l'infection à *Botrytis cinerea* sur les fruits de tomate en présence des composés organiques volatils bactériens endophytes à 6 jours après l'infection.

Un plan expérimental en Split plot a été utilisé dans ce test. L'expérience a été répétée trois fois avec deux blocs dans chaque répétition. Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où les bactéries endophytes, les souches de *B. cinerea* (S2 et S5) et leur interaction ont été considérées comme des effets fixes, tandis que le répétition, le bloc et la boîte ont été traités comme des effets aléatoires. Les données du témoin négatif d'inoculation fongique (fruits inoculés avec du milieu PDA) n'ont pas été intégrées dans l'analyse statistique. Codes de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1.

Source de variation	df	Diamètre de pourriture		Profondeur de pourriture	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Souche bactérienne	5	3.7286	0.087486 .	1.4592	0.20479
Souche de Botrytis	1	14.5479	0.000183 ****	1.7555	0.18670
Souche bactérienne * Souche de Botrytis	5	0.5880	0.709189	1.0594	0.38416

L'analyse de la variance des données du test de bio-protection en utilisant les cellules bactériennes a révélé une interaction significative entre les bactéries et les souches fongiques pour la profondeur de pourriture et une interaction sub-significative pour le diamètre de pourriture à 6 jours après l'infection par *B. cinerea* (Tableau 22). En général, les souches de bactéries ont eu un effet majeur sur la profondeur par rapport au diamètre de pourriture, la souche BF11 présentant le plus fort effet bio-protecteur contre les deux souches fongiques (Figure 35). Les souches de bactéries endophytes H1F1 et DHT2 ont également réduit le diamètre de pourriture de la souche de *B. cinerea* S5 sur les fruits de tomate infectés (Figure 35B). Toutes les souches de bactéries étudiées ont réduit la profondeur de la pourriture due à l'infection de la souche *B. cinerea* S2 sur le fruit de la tomate (Figure 35C). À l'exception de la souche TR1, les souches de bactéries utilisées ont réduit de manière significative la profondeur de la pourriture due à l'infection de la souche *B. cinerea* S5 sur les fruits de la tomate, mais à un degré moindre que celui observé pour la souche S2 (Figure 35).



**Figure 35.** Effet du traitement avec des cellules végétatives de cinq souches de bactéries endophytes sur l'infection par les souches S2 et S5 de *Botrytis cinerea* sur les fruits de tomate. (A) Photos de fruits de tomate traités ou non (sans bactéries) avec la suspension des cellules bactériennes à six jours après l'infection par les souches S2 et S5 de *B. cinerea*. Les boîtes à moustaches représentent le diamètre (B) et la profondeur (C) de la pourriture des fruits causée par les souches S2 et S5 de *B. cinerea* ou dans la condition témoin non inoculée à 6 jours après l'infection. Les données proviennent de trois expériences indépendantes. Les étoiles ou les points entre parenthèses indiquent une différence significative par rapport au traitement «sans bactéries» comme indiquée par le test de Dunnett. Code de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '·' 0,1 '·' 1.

**Tableau 22.** Analyse de la variance de type III de l'infection à *Botrytis cinerea* sur des fruits de tomate après traitement avec des cellules végétatives de cinq bactéries endophytes à 6 jours après l'infection.

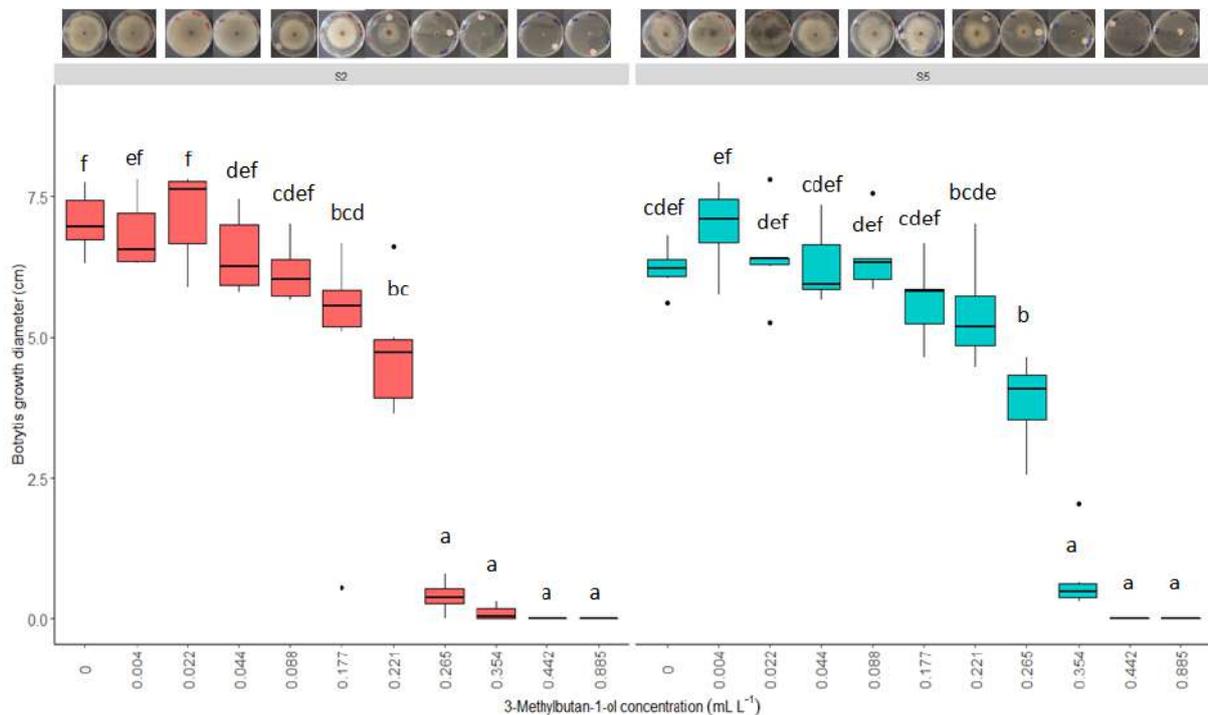
Un plan expérimental en Split plot a été utilisé dans ce test. L'expérience a été répétée trois fois avec deux répétitions pour chaque traitement. Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où les bactéries endophytes, les souches de *B. cinerea* (S2 et S5) et leur interaction ont été traitées comme des effets fixes, tandis que les répétitions, les blocs et la boîte ont été traités comme des effets aléatoires. Les données du témoin négatif d'inoculation fongique (fruits inoculés avec du milieu PDA) n'ont pas été intégrées dans l'analyse statistique. Codes de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '!' 0,1 ' ' 1.

Source de variation	df	Diamètre de pourriture		Profondeur de pourriture	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Souche bactérienne	5	1.8734	0.25374	3.4324	0.1010336
Souche de Botrytis	1	370.3763	< 2e-16 ***	13.1802	4.327e-06 ***
Souche Bactérienne * Souche de Botrytis	5	1.6731	0.08952 .	3.4896	0.0003036 ***

## 7. Activité antifongique du composé volatil majeure le 3-méthylbutan-1-ol

### 7.1. Activité antifongique sur les colonies fongiques *in vitro*

L'analyse de variance de la croissance des colonies de *B. cinerea* en présence de 3-méthylbutan-1-ol à 5 jours d'exposition montre qu'elle dépend de la souche fongique, de la concentration de ce composé et de leur interaction (Tableau 23). Le 3-méthylbutan-1-ol a montré une activité antifongique significative contre la souche S2 à partir 0,177 mL L<sup>-1</sup> et contre S5 à partir 0,221 mL L<sup>-1</sup> par rapport au témoin (Figure 36). La concentration de 3-méthylbutan-1-ol qui inhibe 50% de la croissance fongique (CI50) et celle qui inhibe 100% de la croissance fongique (CI100) contre les deux souches de *B. cinerea* est d'environ 0,221 mL L<sup>-1</sup> et 0,442 mL L<sup>-1</sup>, respectivement (Figure 36).



**Figure 36.** Activité antifongique *in vitro* du composé volatil 3-méthylbutan-1-ol contre les souches S2 et S5 de *Botrytis cinerea*. L'activité antifongique a été évaluée par la diminution de la croissance des colonies fongiques par rapport au témoin «sans 3-méthylbutan-1-ol» sur milieu PDA après 5 jours de co-confrontation. Une boîte représentative de chaque combinaison de concentration de 3-méthylbutan-1-ol/souche de champignon est représentée en haut du graphique. Deux répétitions indépendantes avec trois boîtes pour chaque combinaison de concentration de 3-méthylbutan-1-ol / souche fongique ont été réalisées. Les lettres identifient des groupes significativement différents selon le test de Tukey pour des comparaisons multiples des moyennes à \* P ≤ 0,05.

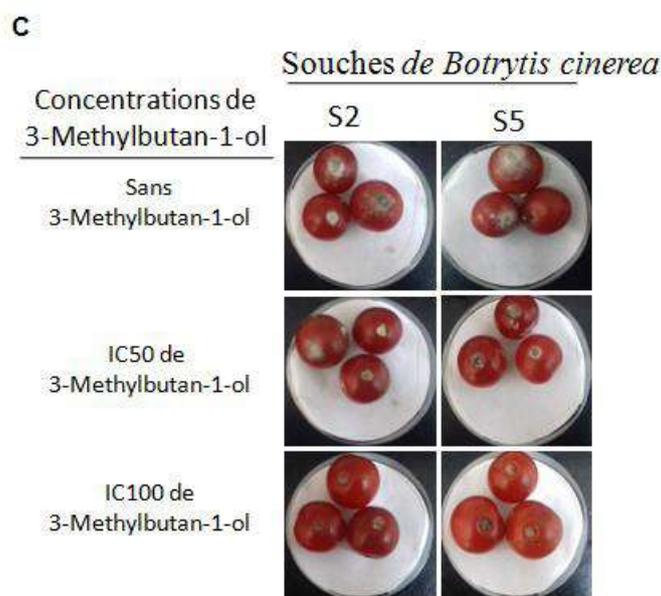
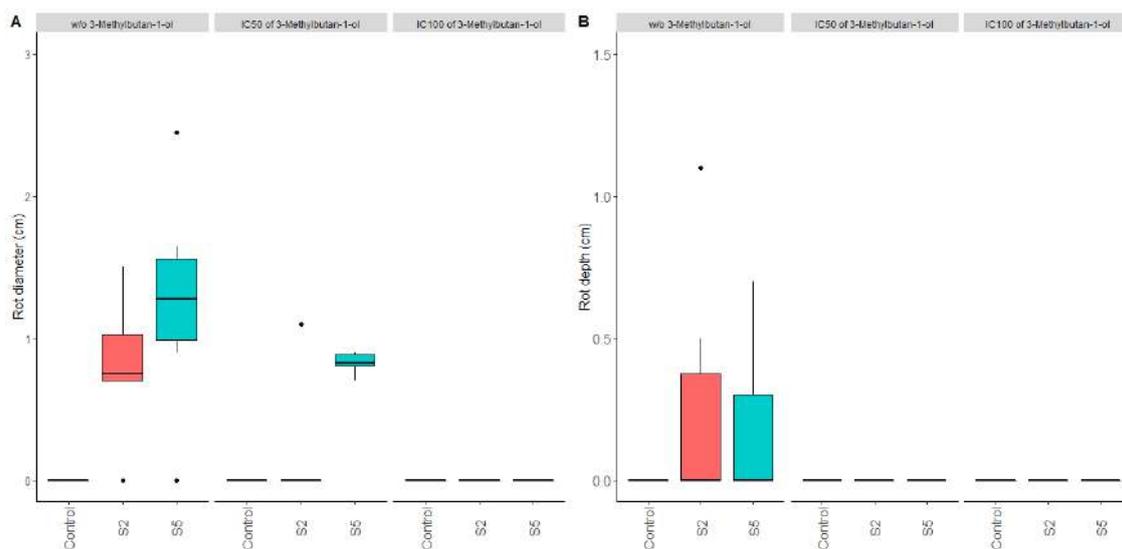
**Tableau 23.** Analyse de la variance de type III de la croissance des colonies de *Botrytis cinerea* en présence du composé volatil 3-méthylbutan-1-ol à 5 jours de confrontation.

Les données ont été analysées par un modèle linéaire mixte où la concentration de 3-méthylbutan-1-ol et les souches de *B. cinerea* et leur interaction ont été considérées comme des effets fixes et la répétition de l'expérience a été considérée comme un effet aléatoire. Codes de signification P: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1.

Source de variation	Croissance fongique		
	df	F value	Pr(>F)
Souche de Botrytis	1	8.1848	0.005065 **
Concentration	10	177.8352	< 2.2e-16 ***
Souche de Botrytis *Concentration	10	6.9283	2.546e-08 ***

## **7.2. Test de bioprotection par 3-méthylbutan-1-ol contre l'infection par *Botrytis cinerea* sur les fruits de tomate**

L'analyse de variance du diamètre et de la profondeur de la pourriture de *B. cinerea* sur les fruits de tomate en présence de 3-méthylbutan-1-ol après 6 jours d'infection dépend principalement de la concentration de ce composé (Tableau 24). Le 3-méthylbutan-1-ol a diminué de manière significative le diamètre et la profondeur de la pourriture de *B. cinerea* pour les deux souches fongiques à IC50 et IC100 avec un effet plus important de la concentration IC100 qui inhibe totalement l'infection fongique. De plus, aucun symptôme de phytotoxicité n'a été observé sur les fruits de tomate (Figure 37 A – C).



**Figure 37.** Effet du 3-méthylbutan-1-ol sur l'infection à *Botrytis cinerea* sur les fruits de tomate. Les boîtes à moustaches représentent le diamètre (A) et la profondeur (B) de la pourriture causée par les souches S2 et S5 de *Botrytis cinerea* ou le témoin à 6 jours après l'infection des fruits de tomate exposés ou non au 3-méthylbutan-1-ol à la concentration qui inhibe 50% la croissance fongique (IC50 = 0,221 mL L<sup>-1</sup>) et la concentration qui inhibe 100% de la croissance fongique (IC100 = 0,442 mL L<sup>-1</sup>). (C) Photos des fruits de tomate à 6 jours après infection par les souches S2 et S5 de *B. cinerea* et exposés ou non à IC50 et IC100 de 3-méthylbutan-1-ol. Les données ont été obtenues à partir de deux expériences indépendantes. Les étoiles entre parenthèses indiquent une différence significative par rapport au traitement «sans 3-méthylbutan-1-ol» comme indiqué par le test de Dunnett à \* P ≤ 0,05. Codes de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1



**Tableau 24.** Analyse de la variance de type III de l'infection à *Botrytis cinerea* sur des fruits de tomate en présence du composé volatil le 3-méthylbutan-1-ol près 6 jours d'infection.

Un plan expérimental en Split plot a été utilisé dans ce test. L'expérience a été répétée deux fois. Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où le traitement au 3-méthylbutan-1-ol, les souches de *B. cinerea* (S2 et S5) et leur interaction ont été considérés comme des effets fixes, tandis que les répétitions ont été considérées comme des effets aléatoires. Les données sur les fruits inoculés avec le milieu PDA au lieu de la culture de *B. cinerea*, n'ont pas été intégrées dans l'analyse statistique. Codes de signification P: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1.

Source de variation	df	Diamètre de Pourriture		Profondeur de Pourriture	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Souche de Botrytis	1	6.6690	0.01513*	0.1437	0.7074
Traitement	2	17.5157	1.028e-05****	4.1905	0.0252*
Souche de Botrytis*Traitement	2	1.8062	0.18227	0.1437	0.8668

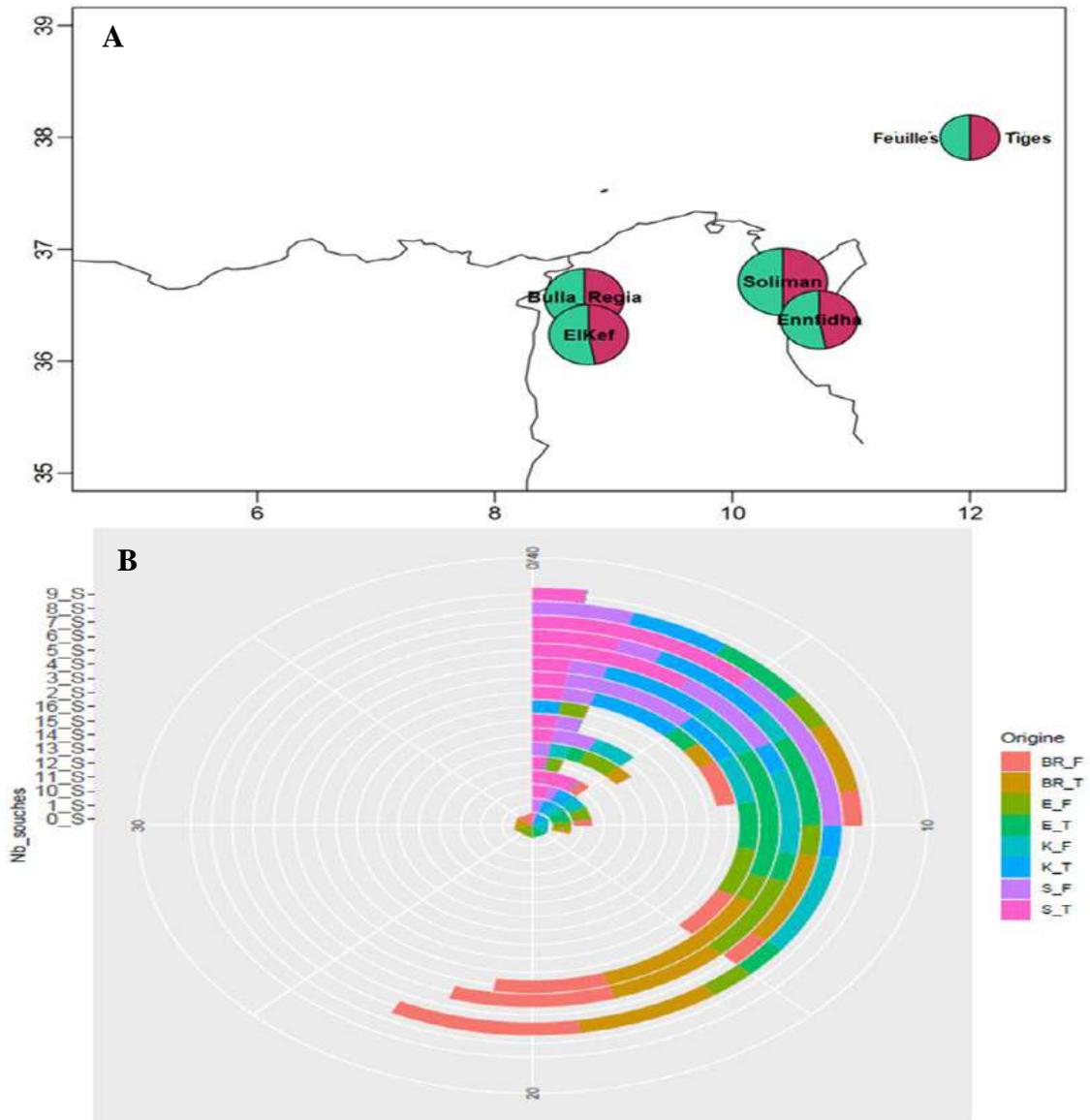
**Chapitre 2 : Evaluation de l'activité antifongique et de bio-protection des consortia bactériens endophytes de *Medicago truncatula* contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae***

## Chapitre 2 : Evaluation de l'activité antifongique et de bio-protection des consortia bactérien endophytes de *Medicago truncatula* contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae*

### 1. Caractérisation de la collection de bactéries endophytes de *M.truncatula*

Neuf cent soixante-seize souches de bactéries endophytes ont été isolées à partir de deux organes (feuilles et tiges) de plantes de *M. truncatula* saines collectées dans quatre sites du Nord tunisien, incluant deux sites salins (Ennfidha et Soliman) et deux sites non salins (Bulla-Regia et Elkef) (Figure 38A). Toutes les souches isolées se caractérisent par une croissance rapide (<24 h). Une grande variété en termes de couleur et de forme de colonies a été observée pour chaque site (Figure 39). La collection est équilibrée au niveau de l'organe d'isolement (50% des souches proviennent des feuilles et 50% proviennent des tiges). En terme d'enrichissement selon le site d'isolement, le site de Soliman présente l'ensemble de souches significativement le plus abondant (*P-value* du test  $\text{Khi}^2$  : 3.304e-11) avec 348 souches bactériennes endophytes. Les sites de Bulla-Regia, Ennfidha et ElKef présentent respectivement des ensembles de souches bactériennes endophytes comptant 211, 214 et 227 souches.

La reconstitution du microbiote de chaque organe de chaque plante collectée à chaque site a donné 160 consortia dont 78 consortia des tiges et 82 consortia des feuilles. Le nombre de consortia reconstitués varie entre 18 consortia provenant des feuilles à Ennfidha à 24 consortia pour les feuilles et les tiges collectées à sur le site de Soliman. De manière intéressante, le nombre de consortia reconstitués n'est pas significativement différents entre les sites d'origine, contrairement au nombre de souches bactériennes individuelles (*P-value* du test  $\text{Khi}^2$  : 0.5508). Ce résultat indique que la complexité des consortia en termes de nombre de souches varie entre les sites. Plus précisément, la composition des consortia en bactéries varie selon la plante collectée, l'organe et le site d'origine (de 1 à 16 bactéries), par exemple le site Soliman, les consortia à 7 souches bactériennes endophytes sont les plus abondant. Les sites Elkef et Ennfidha sont les seuls deux sites présentant des consortia à 16 bactéries endophytes (Figure 38B).



**Figure 38.** (A) Collection de souches bactériennes endophytes isolées à partir de deux organes de plantes de *M.truncatula* collectées dans les sites du Nord de la Tunisie (Soliman, Ennfidha, Bulla-Regia et ElKef). Localisation des sites de collecte au Nord de la Tunisie. La carte géographique a été construite à l'aide des packages mapdata et mapplots. (B) Graphique « Sunburst » montrant la complexité des consortia bactériens endophytes en termes de nombre de souches bactériennes pour chaque origine (combinaison Site\_organe) avec BR\_F pour Bulla-Regia\_Feuille ; BR\_T pour Bulla-Regia\_Tige ; E\_F pour Ennfidha\_Feuille ; E\_T pour Ennfidha\_Tige ; K\_F pour ElKef\_Feuille ; K\_T pour ElKef\_Tige ; S\_F pour Soliman\_Feuille et S\_T pour Soliman\_Tige. Le graphique « Sunburst » a été construit à l'aide du package ggplot du logiciel R.



**Figure 39.** Illustration de la diversité morphologique des souches bactériennes issues des sites de collecte des échantillons de plantes de *Medicago truncatula* (Soliman, Ennfidha, Bulla-Regia et ElKef)

## 2. Activité antifongique des consortia bactériens contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae*

### 2.1. Activité antifongique des cellules végétatives des consortia bactériens contre *P.medicago* et *V.alfalfae*

Les tests d'activité d'antagonisme direct entre les consortia bactériens et les souches Pm8 de *P.medicago* et V31.2 de *V.alfalfae* ont montré que l'activité antifongique varie selon le consortia bactérien et la souche fongique (Figure 40). L'expérience a été réalisée en « augmented block design » avec 4 'checks' (ou souches de référence) évalués dans tous les blocs : Arqua1 (*Agrobacterium rhizogenes*), DH5-alpha (*Escherichia coli*), RCR2011 (*Sinorhizobium meliloti*), A281 (*Agrobacterium tumefaciens*). La croissance fongique a été suivie à 7 et 14 jours et l'activité antifongique des consortia bactériens contre les souches fongiques a été évaluée en calculant l'aire sous la courbe de progression de croissance (AUGPC). Les résultats ont montré un effet souche fongique. Des interactions significatives ont été trouvées entre la souche fongique et le site d'origine des consortia bactériens, le consortia bactérien, le site d'isolement et l'organe d'isolement (Tableau 25). Pour l'activité antifongique contre Pm8, l'ANOVA sur la base de l'aire sous la courbe de la progression de la croissance fongique (AUGPC) a montré un effet significatif du consortium bactérien (Annexe

9). Cent trente consortia bactériens (soit 92% des consortia) ont montré un effet antagoniste contre *P.medicaginis* avec différents niveaux d'antagonisme (faible, moyen ou fort). Ces consortia appartenaient aux différents sites d'isolement. Les consortia les plus inhibiteurs ont été BF25 (61,86%), EF6 (53,60%) et KT23 (51,25%) (les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir des AUGPC des consortia par rapport aux AUGPC des consortia). La collection présente également des consortia qui ont favorisé la croissance de Pm8 et qui proviennent tous du site Bulla\_Regia mais qui ne sont pas statistiquement significative par rapport au control selon le test Dunnett.

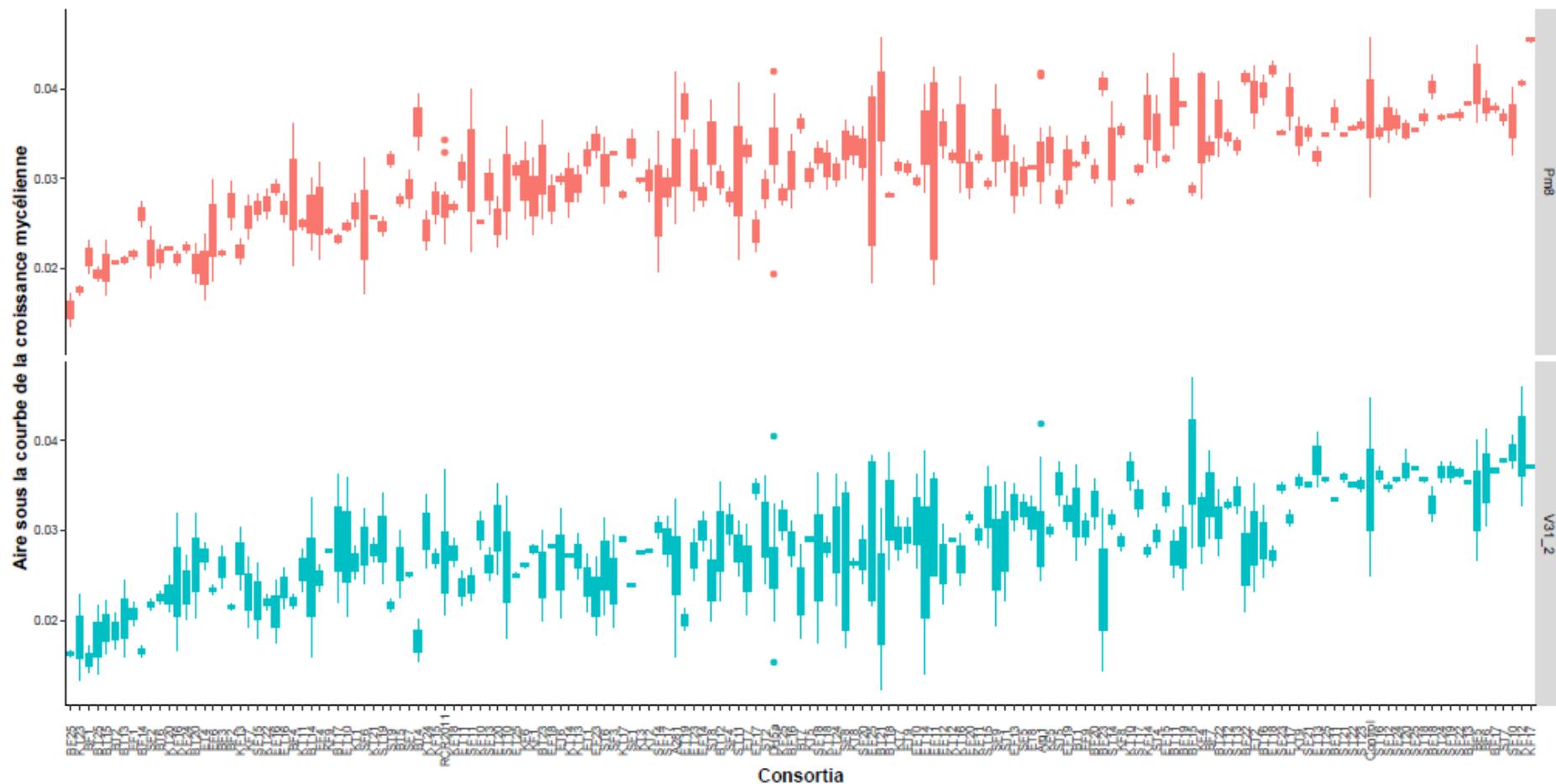
Pour l'activité antifongique contre V31.2, l'ANOVA sur la base de l'aire sous la courbe progressive de croissance (AUGPC) a montré un effet significatif du consortium bactérien (Annexe 11). Cent trente-cinq consortia bactériens (soit 93% des consortia) ont montré un effet antagoniste contre *V. alfalfae* à différents niveaux d'antagonisme (faible, moyen ou fort). Les consortia les plus inhibiteurs ont été BF25 (62,85%), BT4 (53,35%) et BT25 (53,17%). La collection présente entre autre des consortia qui favorisaient la croissance de V31.2 et qui provenaient de tous les sites de collecte mais qui ne sont pas statistiquement significative par rapport au control selon le test Dunnett.

**Tableau 25.** Analyse de la variance de type III de l'activité antifongique des cellules végétatives et les surnageants des consortia bactériens de *Medicago truncatula* contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae*

L'analyse a été réalisée sur la base de l'aire sous la courbe de progression de croissance des champignons (AUGPC). Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où les souches fongiques, le site d'origine des consortia et l'organe d'origine des consortia et leur interaction ont été considérées comme des effets fixes. L'expérience indépendante a été traitée comme un effet aléatoire.

Codes de signification pour les valeurs P: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1.

Source de Variation	DF	Cellules végétatives		Surnageants	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
<b>Souche_fongique</b>	1	18.4754	2.215e-05 ***	44.1428	7.424e-11***
<b>Sites</b>	3	1.3307	0.271582	2.7841	0.0464341*
<b>Organes</b>	1	1.2931	0.255984	0.0000	0.9966066
<b>Souche_fongique:Sites</b>	3	1.8471	0.137707	5.5239	0.0009669***
<b>Souche_fongique:Organes</b>	1	0.5178	0.472106	0.3906	0.5322668
<b>Sites:Organes</b>	3	4.0078	0.007725**	4.6159	0.0033681**
<b>Souche_fongique:Sites:Organes</b>	3	1.3744	0.249700	1.0646	0.3636627

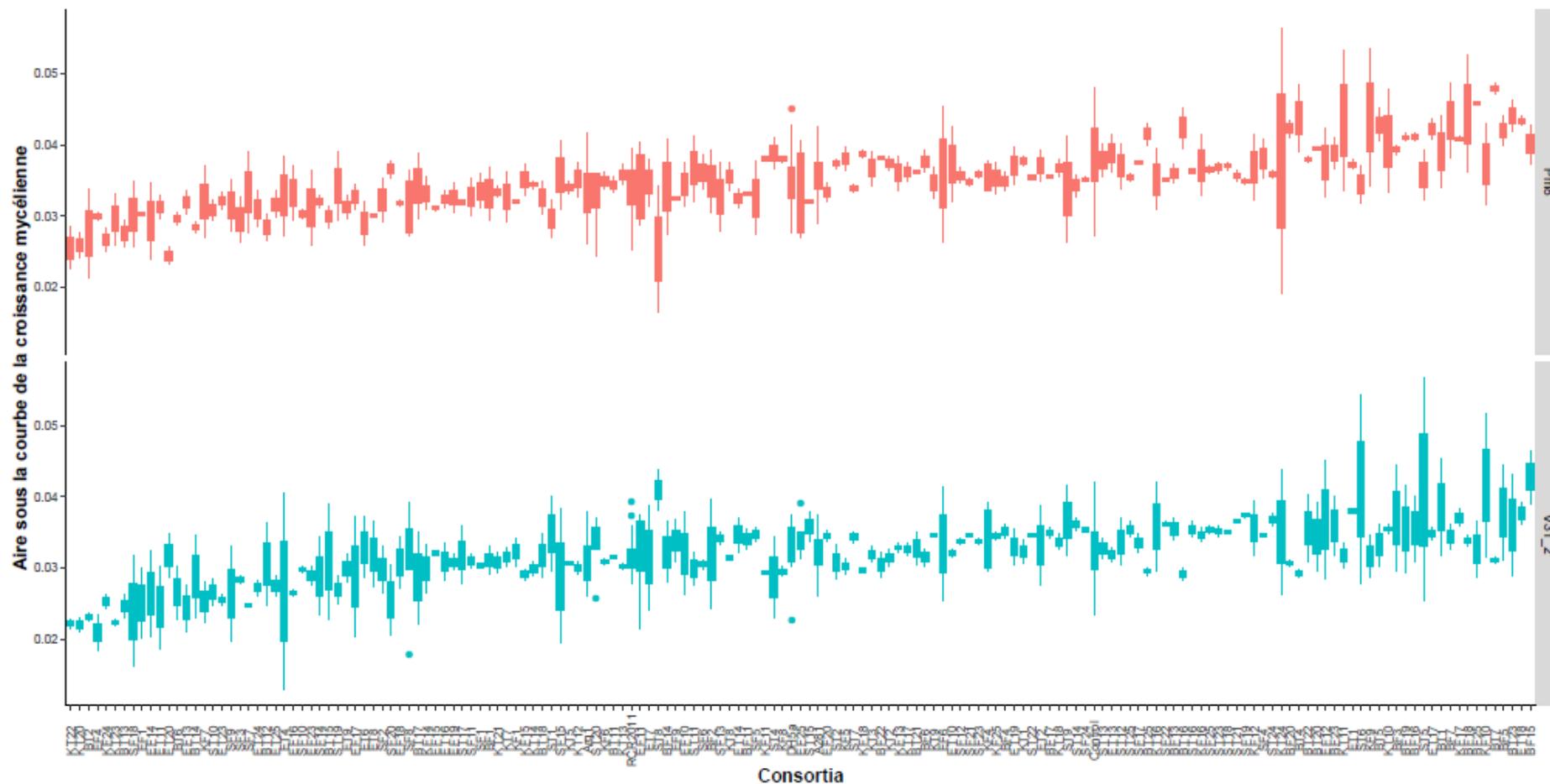


**Figure 40.** Activité antifongique *in vitro* des consortia bactériens endophytes contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae* sur la base de l'aire sous courbe de progression de la croissance (AUGPC) des souches fongiques. Deux répétitions biologiques ont été réalisées pour chaque combinaison de consortia-champignon.

## 2.2. **Activité antifongique des filtrats des consortia bactériens contre *P.medicaginis* et *V.alfalfae***

Les tests d'activité d'antagonisme des filtrats des consortia bactériens contre les souches Pm8 de *P.medicaginis* et V31.2 de *V.alfalfae* ont montré que l'activité antifongique varie selon le consortium bactérien et la souche fongique (Figure 41). L'expérience a été réalisée en « augmented block design » avec 4 'checks' (ou souches de référence) évalués dans tous les blocs : Arqual (*Agrobacterium rhizogenes*), DH5-alpha (*Escherichia coli*), RCR2011 (*Sinorhizobium meliloti*), A281 (*Agrobacterium tumefaciens*). La croissance fongique a été suivie à 7 et 14 jours et l'activité antifongique des consortia bactériens contre les souches fongiques a été évaluée en calculant l'aire sous la courbe de progression de croissance (AUGPC). Une interaction significative a été trouvée entre les souches fongiques et le site d'isolement des consortia bactériens (Tableau 25). Pour l'activité antifongique contre Pm8, l'ANOVA sur la base de l'aire sous la courbe de la progression de la croissance fongique (AUGPC) a montré un effet significatif du consortium bactérien (Annexe 12). Quarante-deux consortia bactériens (soit 63 % des consortia) ont montré un effet antagoniste contre *P.medicaginis* et *V.alfalfae* avec différents niveaux d'antagonisme (faible, moyen ou fort). Ces consortia appartenaient aux différents sites d'isolement. Le consortium KT20 a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé lors de l'utilisation du filtrat de culture bactérienne qui inhibe la croissance de *P.medicaginis* de 34,49% et le consortium EF4 est le plus inhibiteur de *V.alfalfae* avec un pourcentage d'inhibition égale à 40,41%.

La collection présente également des consortia qui favorisaient la croissance de Pm8 et V31.2 et qui provenaient de tous les sites de collecte mais qui ne sont pas statistiquement significative par rapport au contrôle selon le test Dunnett.

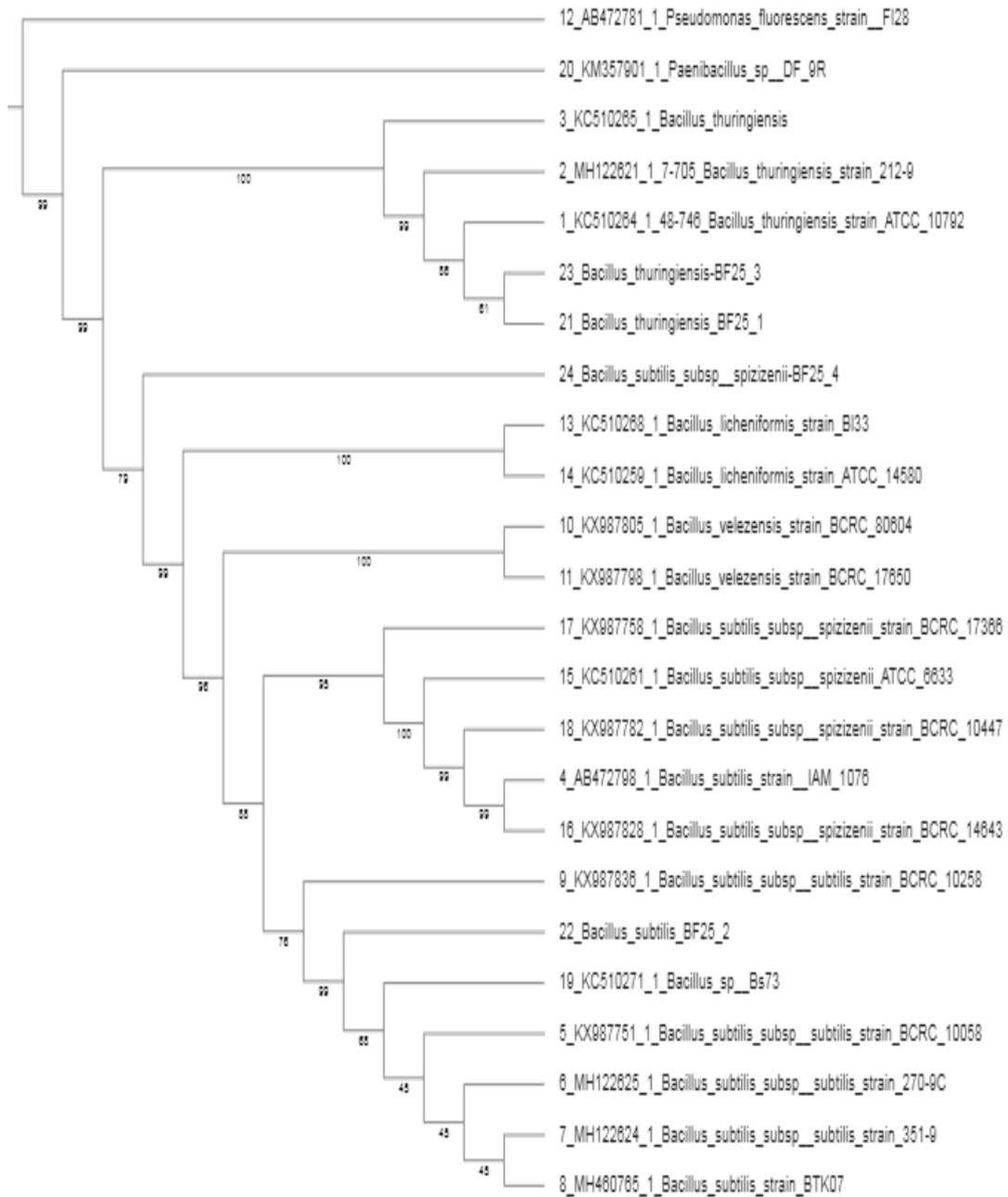


**Figure 41.** Activité antifongique *in vitro* des filtrats des consortia bactériens endophytes contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalfae* sur la base de l'aire sous courbe de progression de la croissance (AUGPC) des souches fongiques. Deux répétitions biologiques ont été réalisées pour chaque combinaison de consortia-champignon.

### 3. Etude phylogénétique du consortium bactérien sélectionné

La sélection du consortium le plus actif a été basée sur les résultats des tests d'antagonisme *invitro*. Le consortium ayant l'effet inhibiteur le plus élevé par les cellules végétatives, BF25, a été choisi pour continuer les travaux expérimentaux *in-vivo* sur la plante *M.truncatula*.

Ce consortium est composé de 4 souches bactériennes. Une étude phylogénétique basée sur le séquençage du gène Tuf (Facteur d'élongation) a été faite. Les résultats du Blast ont montré que les souches BF25\_1 et BF25\_3 appartiennent à l'espèce *B. thuringiensis*, la souche BF25\_2 est une souche de *B. subtilis* et BF25\_4 est une souche de *B. subtilis* sp. *spizizenii*. Un arbre phylogénétique (Neighborjoining) des 4 souches de bactéries endophytes constituant le consortium bactérien le plus actif et les souches de bactéries de référence a été obtenu basées sur l'alignement des séquences nucléotidiques du gène de Tuf. La souche *Pseudomonas fluorescens* strain: FI28 a été choisie comme out-group (Figure 42). Les séquences des souches bactériennes ont été déposées dans le site de BankIt.



**Figure 42.**Arbre phylogénétique (Neighborjoining) de 4 souches de bactéries endophytes du consortium BF25 avec une activité antifongique contre *Phoma medicaginis* et *Verticillium alfalafae* et souches de bactéries de référence basées sur l'alignement des séquences nucléotidiques du gène Tuf (Facteur d'élongation). Des valeurs bootstrap supérieures à 50% sont indiquées dans cet arbre.

#### **4. Bio-protection des plantes de *Medicago truncatula* contre l'infection par *Phomamedicaginis***

##### **4.1. Etude des paramètres de croissance et d'infection**

Dans cet essai nous avons évalué l'effet protecteur du consortium le plus actif *in-vitro* sur les plantes de *M.truncatula* contre l'infection *P.medicaginis*. Les paramètres étudiés relatifs à la croissance –incluant le nombre des feuilles vertes (NFV), le nombre des racines secondaires (NRS), la longueur des racines (LR), le poids frais des feuilles (PFF), le poids frais des racines (PFR)- et les paramètres relatifs à l'infection des plantules (longueur du brunissement des racines (BR) et score des pycnides (PYC)) varient significativement avec l'inoculation par BF25 avec ou sans infection par Pm8 pour les deux lignées testées A17 et F83005.5 de *M.truncatula* (Tableau 26 ; Figures 45,46, 44 , 45, 46, 47 et 48)

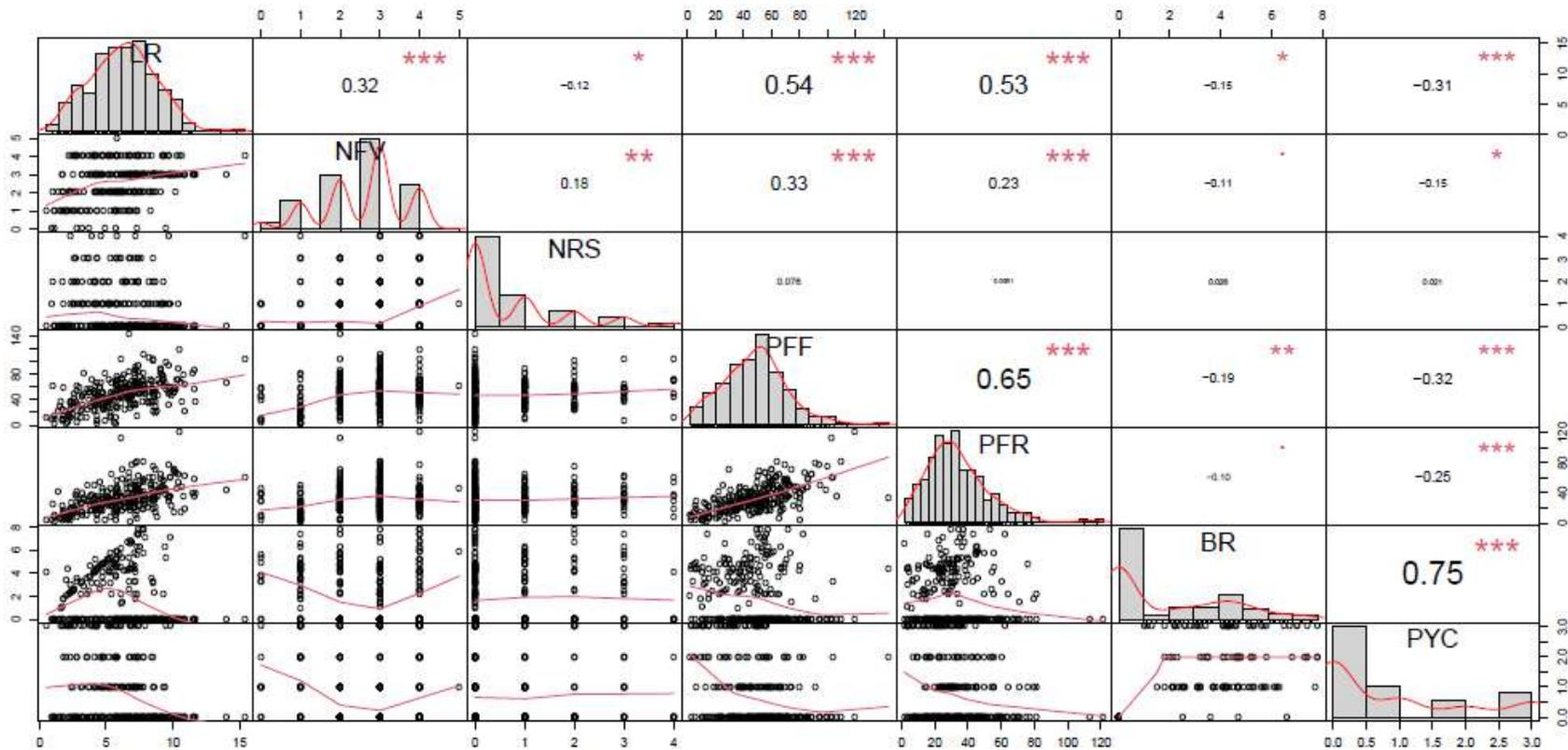
Comme attendu, l'analyse de corrélation entre les différents paramètres de croissance (LR, NFV, NRS, PFF et PFR) a montré qu'ils sont positivement corrélés entre eux mais négativement corrélés aux paramètres d'infection (BR et PYC). Le paramètre NRS est corrélé négativement avec le paramètre LR (Figure 43).

Le regroupement de différents traitements des lignées A17 et F38 prétraitées ou non avec BF25 et infectées ou non avec Pm8 en fonction des paramètres de croissance et d'infection montré cinq groupes de traitements (Figure 44). Le cluster 1 contient le traitement F38 prétraitée seulement avec BF25, avec de fortes valeurs de PYC et des faibles valeurs pour les paramètres de croissances (NFV, LR, PFF, PFR, NRS) ; le cluster 2 contient la lignée F38 infectée seulement avec Pm8 qui présente des fortes valeurs de BR alors que le cluster 3 contient 3 traitements de la lignée A17 à savoir les plantules prétraitées seulement avec BF25, les plantules infectées seulement avec Pm8 et les plantules prétraitées avec BF25 et infectées par Pm8 qui présente des fortes à moyennes valeurs de NRS, BR et PYC et des faibles valeurs de LR, PFF et PFR. Le cluster 4 contient la lignée F38 prétraitée avec BF25 et infectée par Pm8 qui présente des fortes valeurs de LR, PFF et PFR et des faibles valeurs de NFV, NRS, BR et PYC. Le cluster 5 contient les traitements témoins A17 et F83 avec des fortes valeurs de paramètres de croissance et des faibles valeurs de paramètres d'infection.

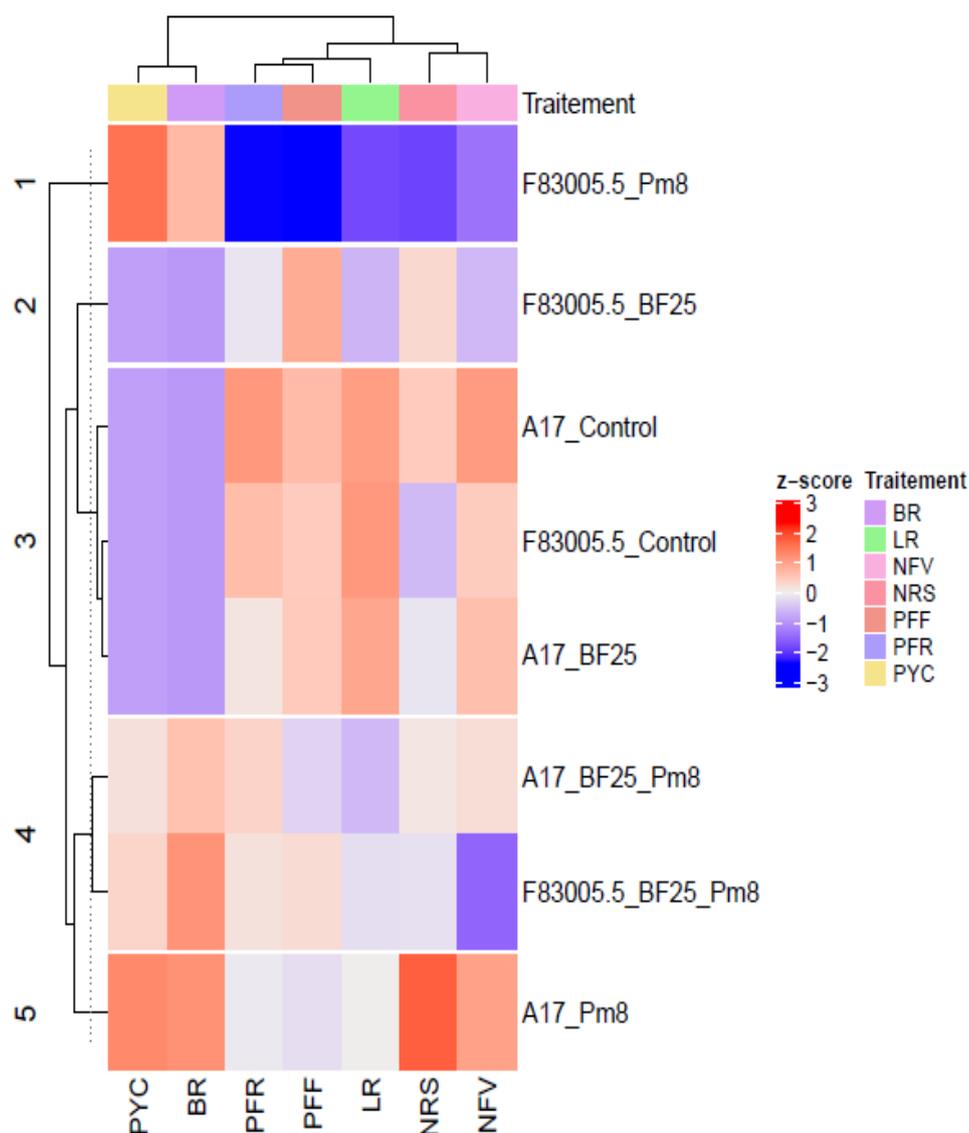
**Tableau 26.** Analyse de la variance de type III de l'AUGPC des paramètres de croissance : Nombre des Feuilles Vertes (NFV), Nombre de Racines Secondaires (NRS), Longueur des Racines(LR), Poids Frais des Feuilles (PFF), Poids Frais des Racines (PFR), de Longueur du Brunissement (BR) et du score de Pycnides (PYC) des plantes *Medicago truncatula* infectées ou pas par *Phoma medicaginis* et pré-inoculées ou pas par le consortium bactérien BF25.

L'analyse a été réalisée sur la base de l'aire sous la courbe de progression des paramètres de croissance (AUGPC). Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où le type de traitement, la lignée de *M.truncatula* et leur interaction ont été considéré comme un effet fixe. L'expérience indépendante a été traitée comme un effet aléatoire. Codes de signification pour P:0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

Source de variation	D	LR		NFV		NRS		PFF		PFR		BR		PYC	
		F	Pr(>F)	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)
<b>Traitement</b>	3	17.200	3.086e-10 ***	6.6258	0.000245 ***	2.8840	0.03645 *	11.0120	7.487e-07 ***	8.9362	1.138e-05 ***	272.132	< 2.2e-16 ***	343.8774	< 2e-16 ***
<b>Lignée</b>	1	33.207	2.287e-08 ***	65.6119	1.763e-14 ***	2.1946	0.13974	1.7428	0.1878819	6.9966	0.008635 **	0.00	0.9994	2.9764	0.08561.
<b>Traitement : Lignée</b>	3	13.111	5.219e-08 ***	1.3760	0.250374	2.1561	0.09376 .	7.2061	0.0001131 ***	3.5221	0.015541 *	11.799	2.983e-07 ***	1.6792	0.17172



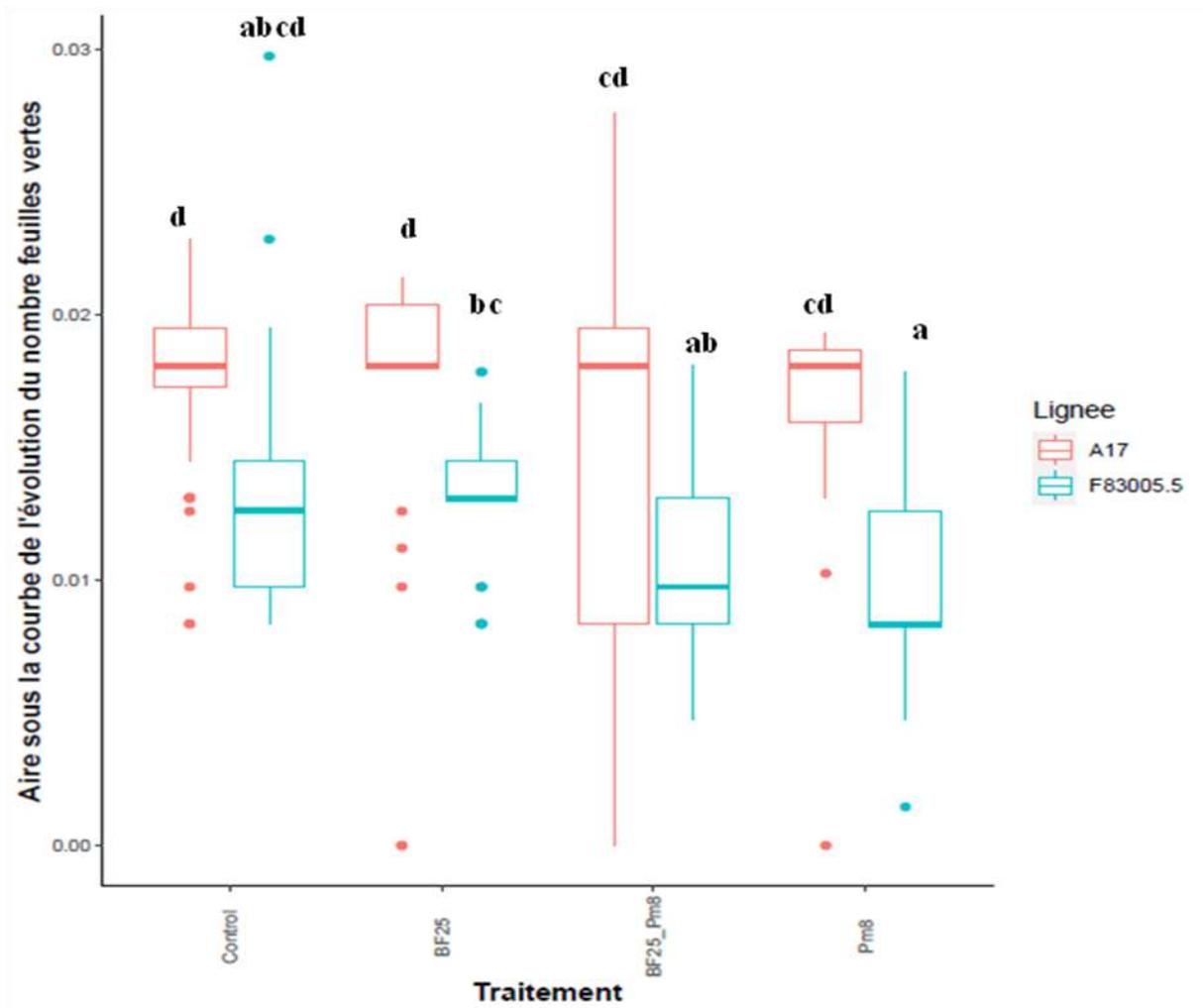
**Figure 43.** Corrélations entre les paramètres de croissance et d'infection mesurés sur des plantes de *Medicago truncatula* prétraitées avec le consortium bactérien endophyte et infectées ou pas par *Phoma medicaginis*. Les coefficients de corrélation de Pearson par paires sont indiqués. Les étoiles représentent des corrélations significatives selon le code de signification suivant pour les valeurs p: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1. Le graphique a été obtenu à l'aide du package psych du logiciels R.



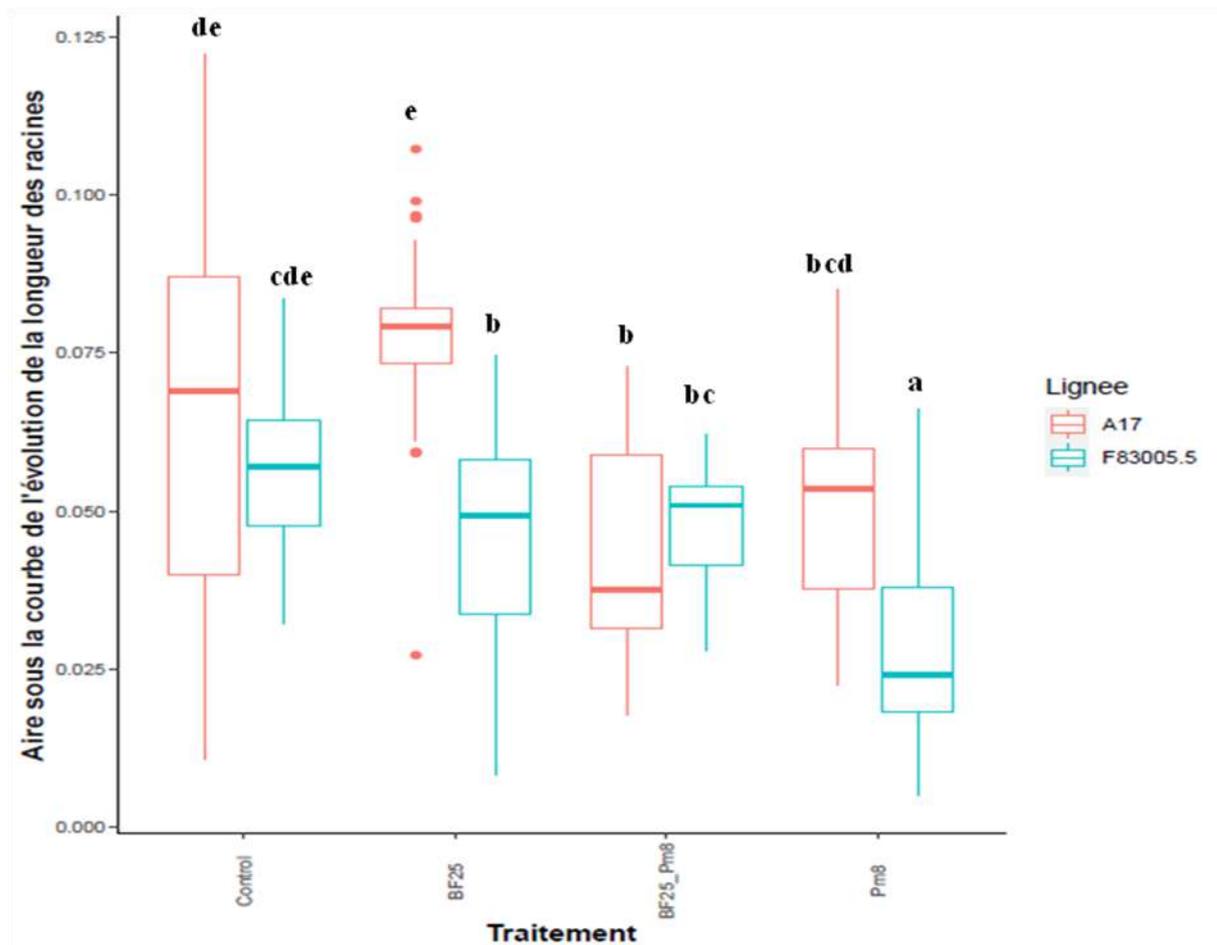
**Figure 44.** Regroupement des traitements (Heatmap) en fonction des paramètres de croissance et de protection des lignées de *Medicago truncatula* (A17 et F38) prétraitées ou pas par le consortium bactérien BF25 contre l'infection par *Phoma medicaginis*. Le regroupement hiérarchique des traitements a été calculé sur la base des corrélations de Pearson. Les scores Z ont été calculés et utilisés pour générer la Heatmap. La couleur rouge indique une activité élevée et la couleur bleue indique une faible activité. Le dendrogramme à gauche montre les se regroupant en fonction de leur activités biologiques (cinq groupes de 1 à 5). Le graphique a été obtenu en utilisant la fonction Heatmap du package ComplexHeatmap du logiciel R.

La comparaison des moyennes a montré que le prétraitement des plantes A17 et F83005.5 par le consortium BF25 n'a pas affecté les paramètres de croissance chez les plantes non infectées par *P. medicaginis* à l'exception du poids frais des racines de A17 (45,46, 44, 45, 46, 47 et 48). D'un autre côté l'infection des plantes par *P. medicaginis* a réduit l'ensemble des paramètres de croissance chez les plantes de F83005.5 non prétraitées par le consortium bactérien BF25 mais pas chez les plantes de la lignée A17. Le prétraitement des plantes par BF25 et leur infection par Pm8 n'a pas montré d'effet par rapport aux plantes infectées seulement par Pm8 chez A17. Par contre il a augmenté significativement la longueur des racines et le poids frais des feuilles et des racines chez F83005.5 (Figures 45,46, 44, 45, 46, 47 et 48).

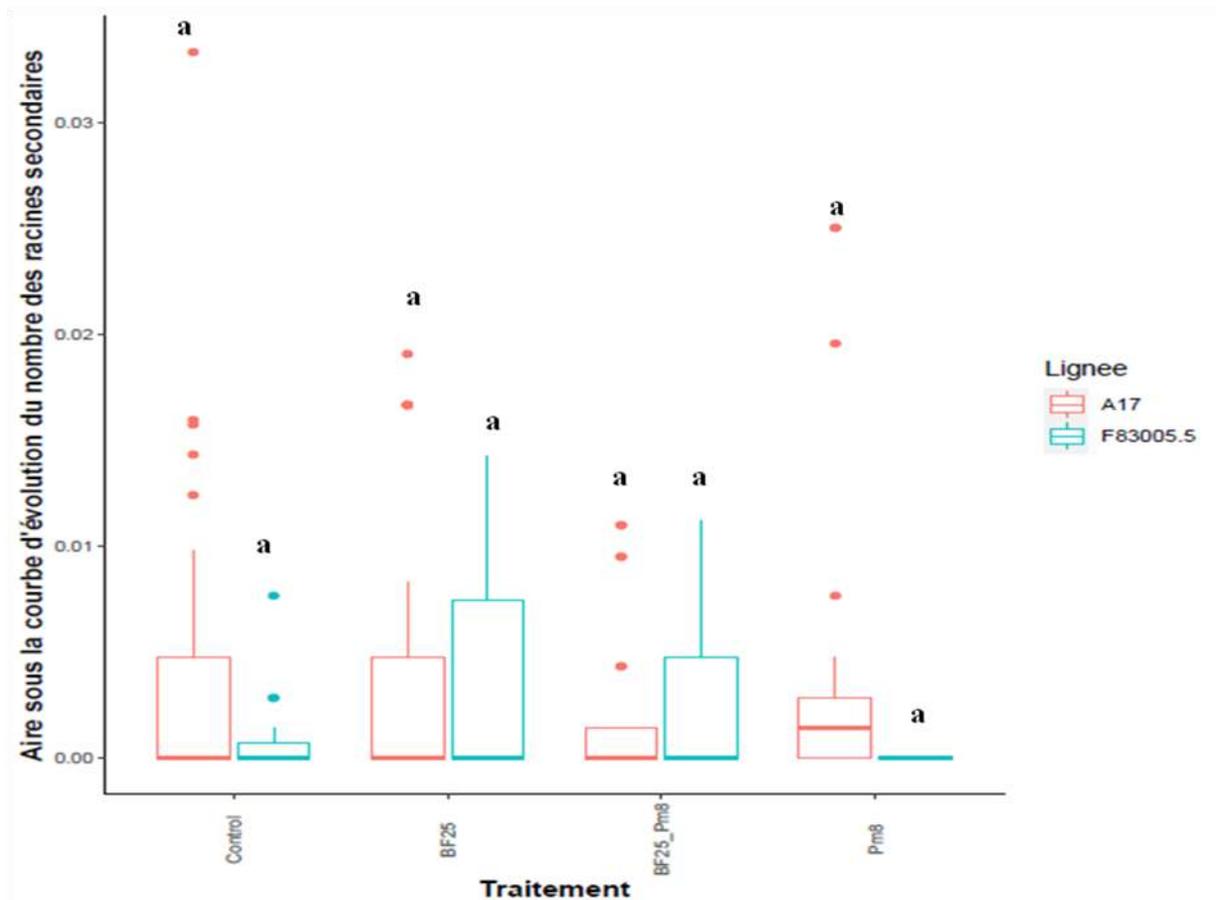
Concernant les paramètres reflétant l'infection, le brunissement des racines (BR) et le score des pycnides (PYC), il y a une diminution du BR chez les plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 en comparaison aux plantes infectées seulement par Pm8 chez la lignée A17 mais pas chez F83005.5 (Figure 49). Pour le paramètre PYC, il y a une diminution chez les plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 en comparaison aux plantes infectées seulement par Pm8 chez les deux lignées de *M. truncatula* (Figure 50).



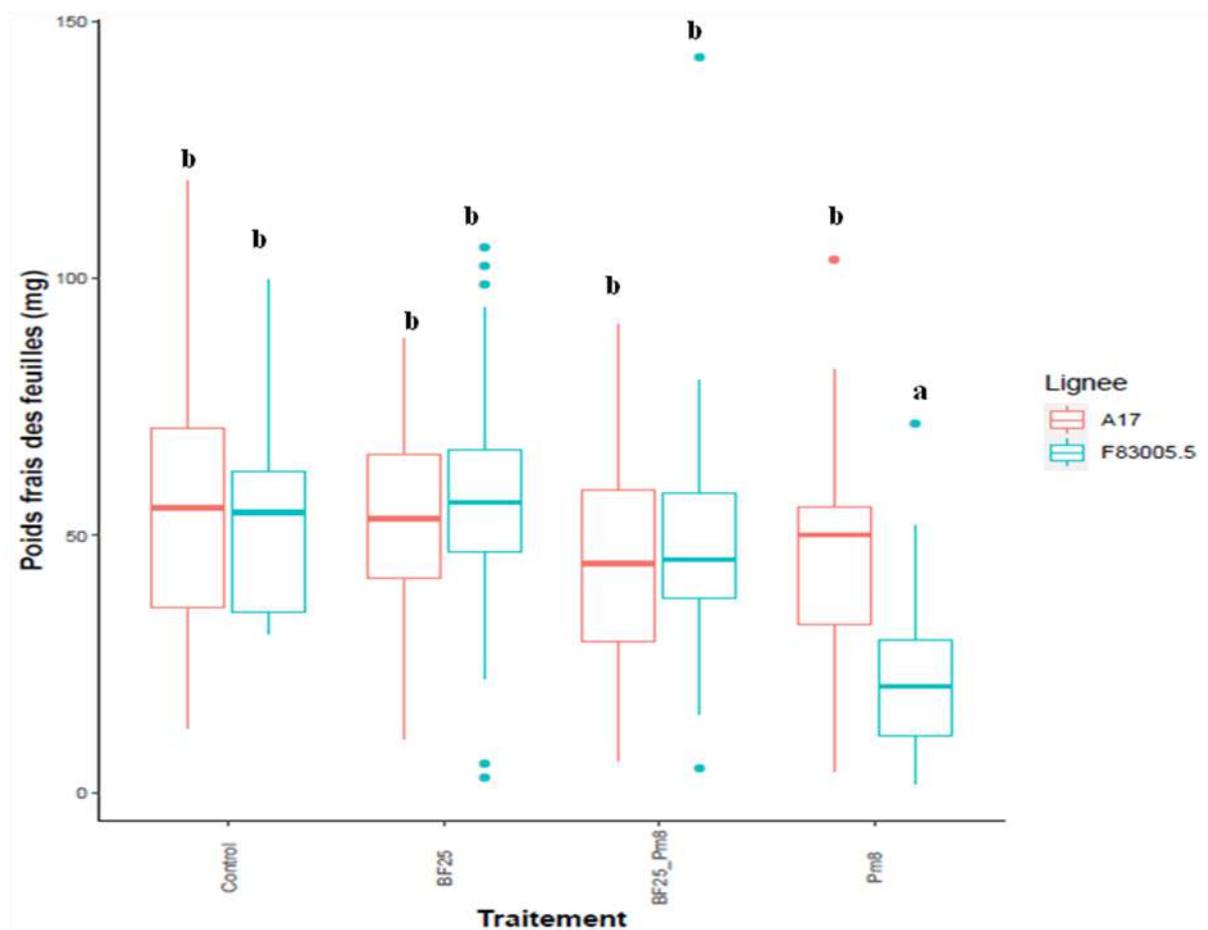
**Figure 45.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* (Pm8) sur l'aire sous la courbe d'évolution du nombre des feuilles vertes chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de *Medicago truncatula*. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



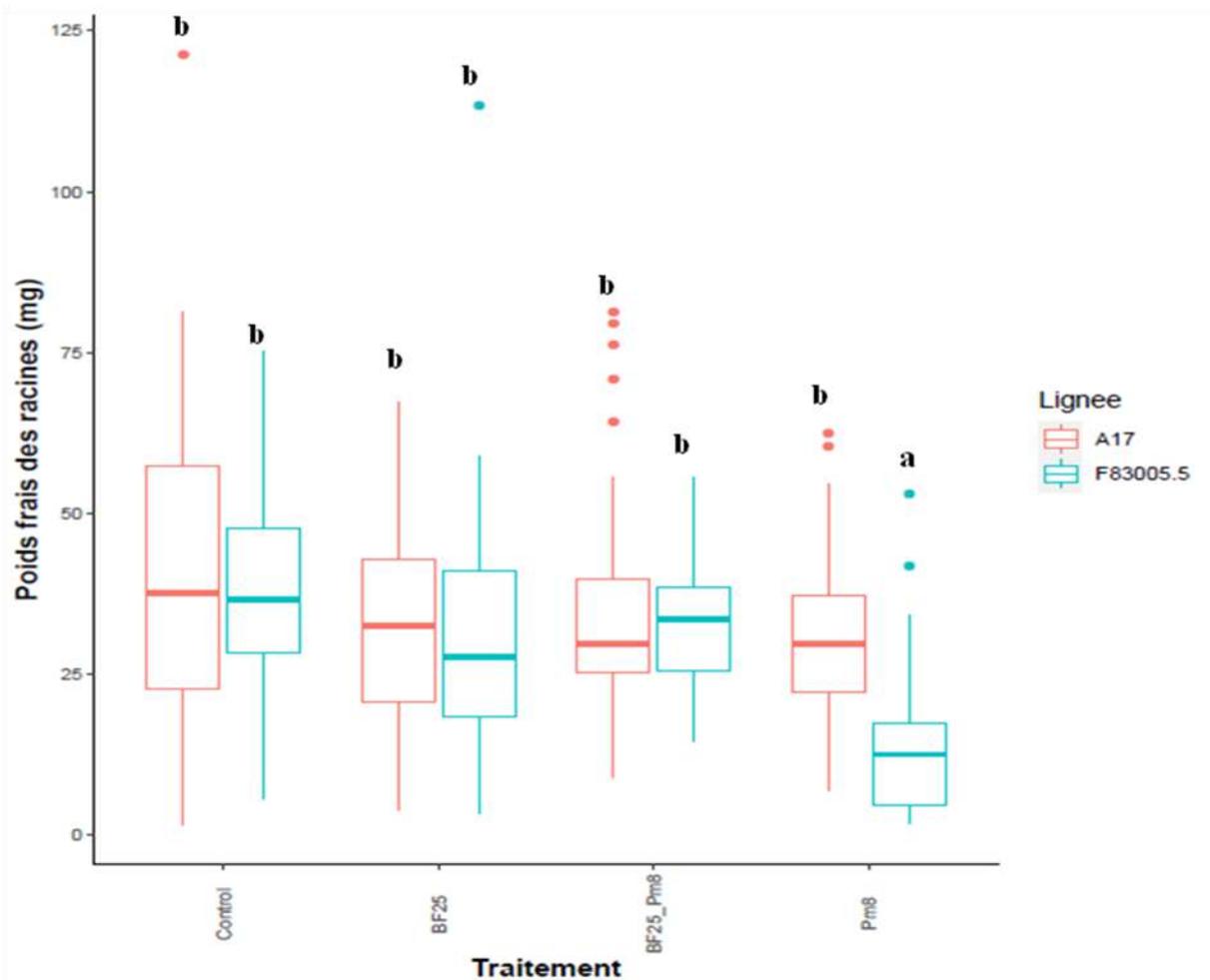
**Figure 46.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* (Pm8) sur l'aire sous la courbe d'évolution de la longueur des racines chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de *Medicago truncatula*. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



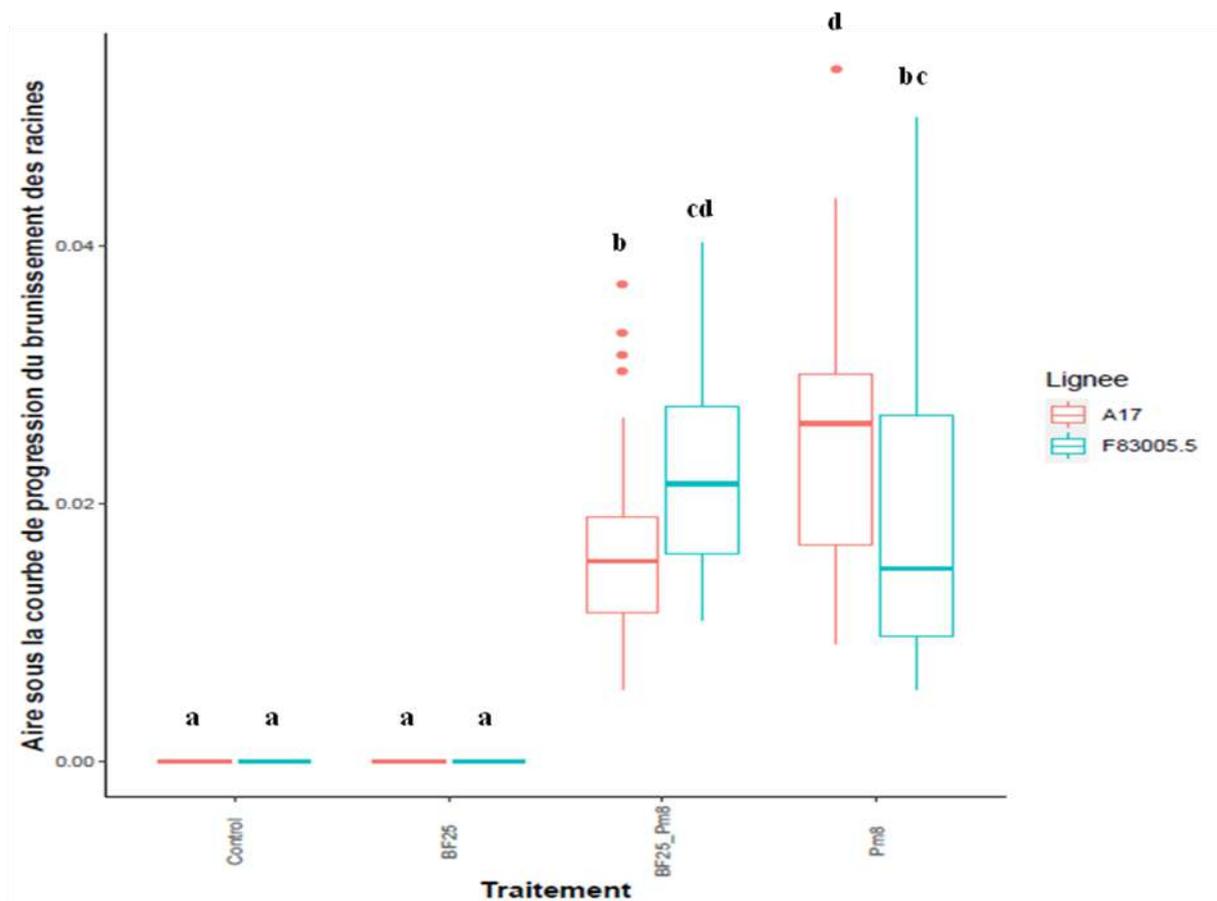
**Figure 47.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* (Pm8) sur l'aire sous la courbe d'évolution du nombre des racines secondaires chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de *Medicago truncatula*. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



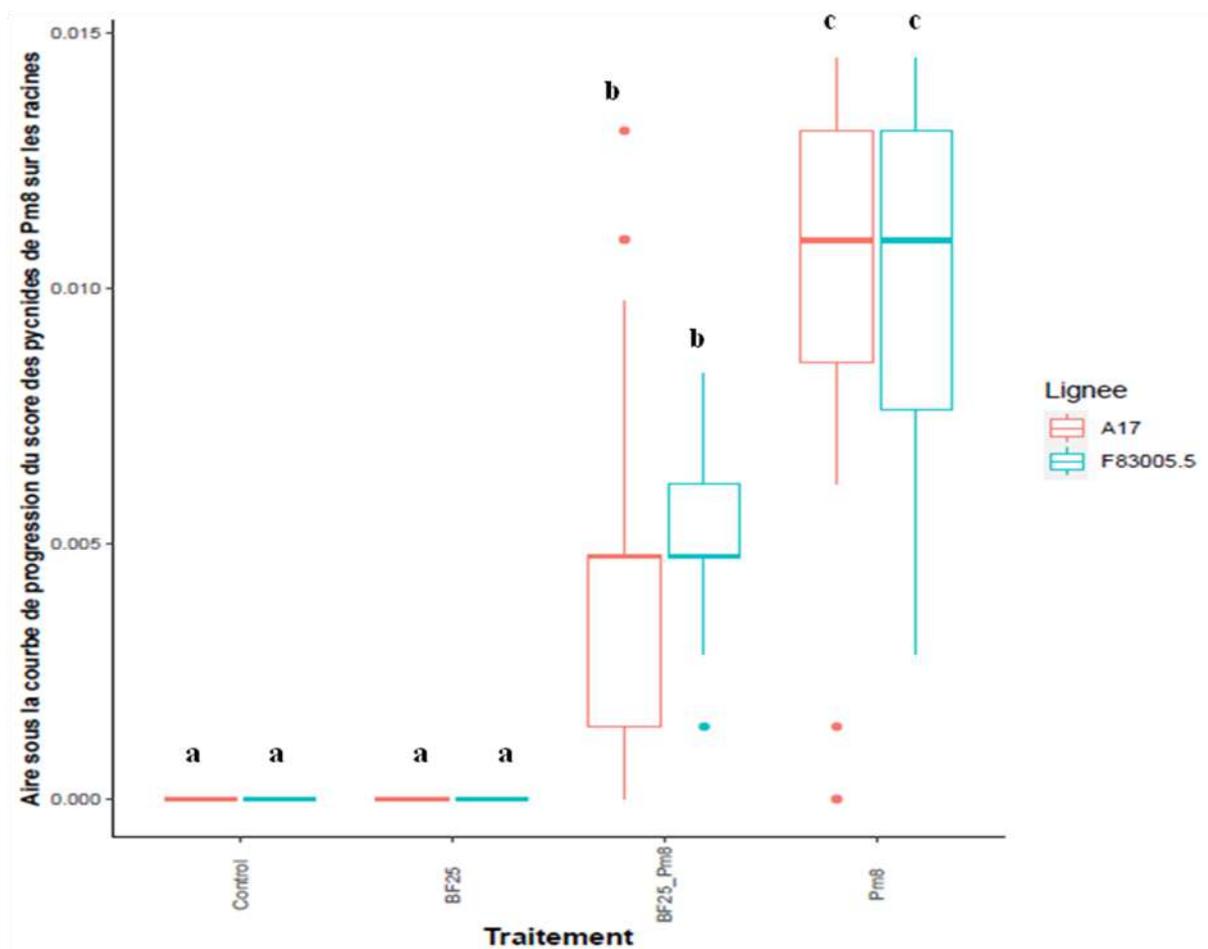
**Figure 48.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* (Pm8) sur le poids frais des feuilles chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de *Medicago truncatula*. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figure 49.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* (Pm8) sur le poids frais des racines chez les deux lignées (A17 et F83005.5) de *Medicago truncatula*. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figure 50.** Effet du prétraitement des lignées A17 et F83005.5 de *Medicago truncatula* par le consortium bactérien BF25 avec ou sans infection par *Phoma medicaginis* (Pm8) sur l'aire sous la courbe de progression du brunissement des racines. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figure 51.** Effet du prétraitement des lignées A17 et F83005.5 de *Medicago truncatula* par le consortium bactérien BF25 avec ou sans infection par *Phoma medicaginis* (Pm8) sur l'aire sous la courbe de progression du score des pycnides de Pm8 sur les racines. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### **3.2. Analyse de l'expression relative des gènes cibles par q-RT-PCR chez les plantes de la lignée A17 de *M.truncatula***

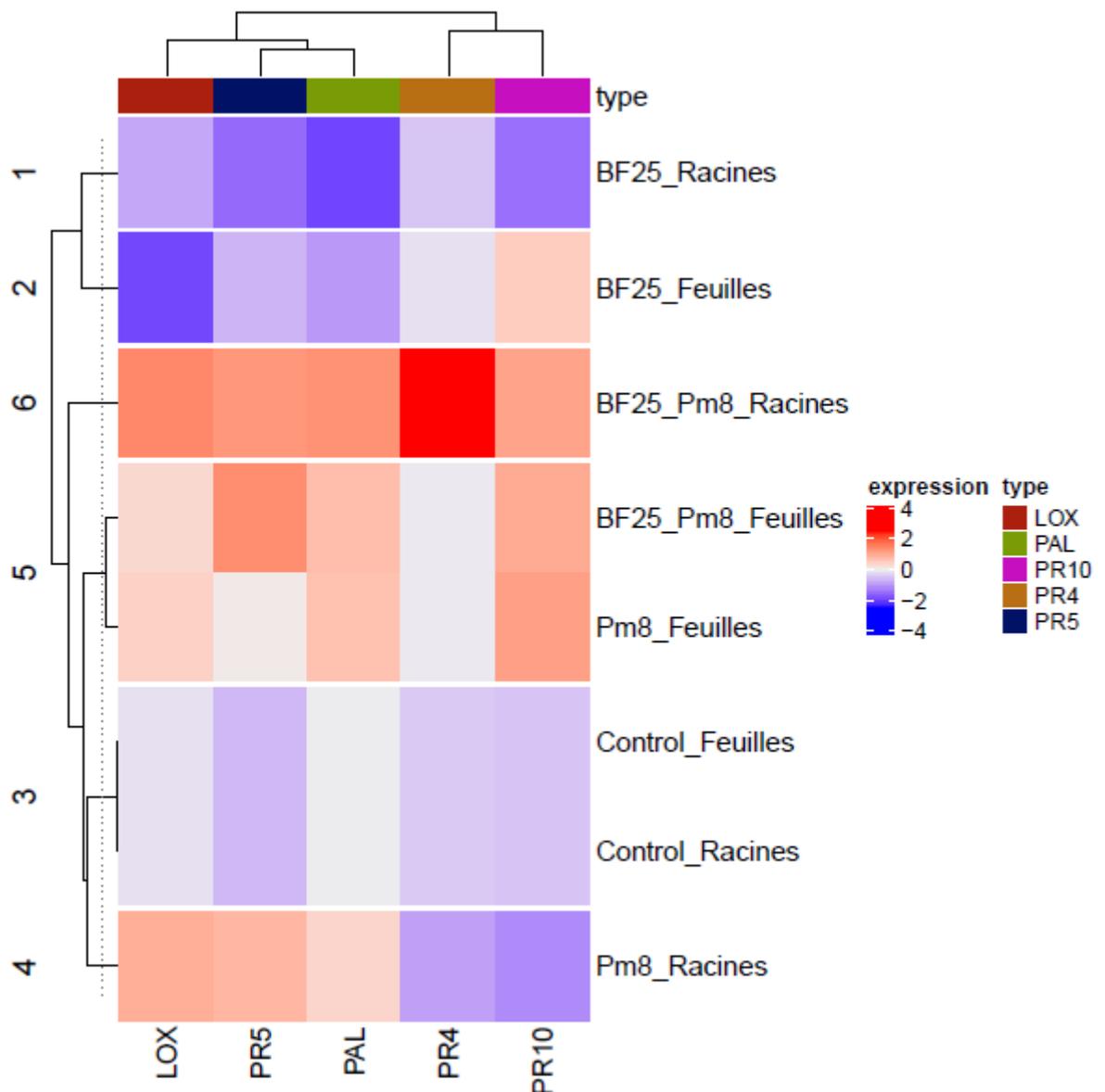
Nous avons étudié l'expression des gènes impliqués dans

- (i) la voie de l'acide Jasmonique-Ethylène (JA/ET), à savoir le gène PAL (phenylalanineammonia-lyase) qui est impliqué dans la biosynthèse des phenylpropanoïdes, et le gène LOX (Lipoxygenase) ;
- (ii) la voie de l'acide salicylique (SA) à savoir le gène PR4 (pathogenesis-relatedprotein 4) qui code pour une chitinase, le gène PR5 (pathogenesis-relatedprotein 5) qui code pour une thaumatin-likeprotein et le gène PR10 (pathogenesis-relatedprotein 10).

Le gène de ménage Act codant pour la  $\beta$ -actine a été choisi comme gène de référence.

L'analyse des résultats de la q-RT-PCR ont montré que l'expression des gènes varie en fonction de l'organe, de l'application ou non du pré-traitement par le consortium bactérien et de l'infection ou pas par Pm8 (Tableau 27).

Le regroupement de différents traitements des organes (Feuilles et Racines) de A17 prétraitées ou non avec BF25 et infectées ou non avec Pm8 en fonction de l'expression des gènes de défense (LOX, PAL, PR4, PR5 et PR10) dans l'échantillon (Figure 52). Le cluster 1 contient le traitement les racines d'A17 prétraitées seulement avec BF25, avec de faible expression pour tous les gènes ; le cluster 2 contient les feuilles d'A17 prétraitées seulement par BF25 qui présente une moyenne expression du gène PR10 uniquement alors que le cluster 3 contient les traitements controls (feuilles et racines) où les gènes sont faiblement exprimés. Le cluster 4 contient les racines d'A17 infectées seulement avec Pm8 présentant une moyenne expression des gènes LOX, PAL et PR4. Le cluster 5 contient les traitements feuilles d'A17 infectées seulement avec Pm8 et les feuilles prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 distinguées par une moyenne à faibles expression de tous les gènes étudiés. Le cluster 6 est représenté par les racines d'A17 prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 qui ont forte expression de tous gènes étudiés (Figure 52)



**Figure 52.** Regroupement des traitements (Heatmap) en fonction de l'expression des gènes de défense (LOX, PAL, PR4, PR5 et PR10). Le regroupement hiérarchique des traitements a été calculé sur la base des corrélations de Pearson. Les scores Z ont été calculés et utilisés pour générer la Heatmap. La couleur rouge indique une activité élevée et la couleur bleue indique une faible activité. Le dendrogramme à gauche montre les traitements se regroupant en fonction de l'expression des gènes de défense (six groupes de 1 à 6). Le graphique a été obtenu en utilisant la fonction Heatmap du package ComplexHeatmap du logiciel R.

Alors que l'expression des gènes LOX et PAL est induite dans les feuilles et les racines par l'inoculation des plantes par le pathogène, une induction encore plus marquée de leur expression est observée dans les racines des plantes ayant subi un pré-traitement par le consortium bactérien préalablement à l'inoculation avec Pm8 (Figure 53 et 54).

Concernant le gène PR4, aucune variation de son expression dans les feuilles et les racines n'a été observée suite au prétraitement par BF25 et à l'infection par Pm8, à l'exception de l'augmentation très significative de son expression dans les racines suite au prétraitement des plantes par B25 et à l'infection par Pm8 (Figure 55). L'expression du gène PR5 est induite dans les racines suite à l'inoculation par Pm8 et très fortement induite dans les deux organes suite au prétraitement des plantes par BF25 et leur infection par Pm8 (Figure 56). Pour le gène PR10, une augmentation significative de l'expression de ce gène a été notée dans les racines des plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 par rapport aux plantes seulement infectées par Pm8, alors que dans les feuilles, ce gène est induit de manière similaire en réponse à l'infection par Pm8 seule ou combinée à un pré-traitement par le consortium bactérien (Figure 57).

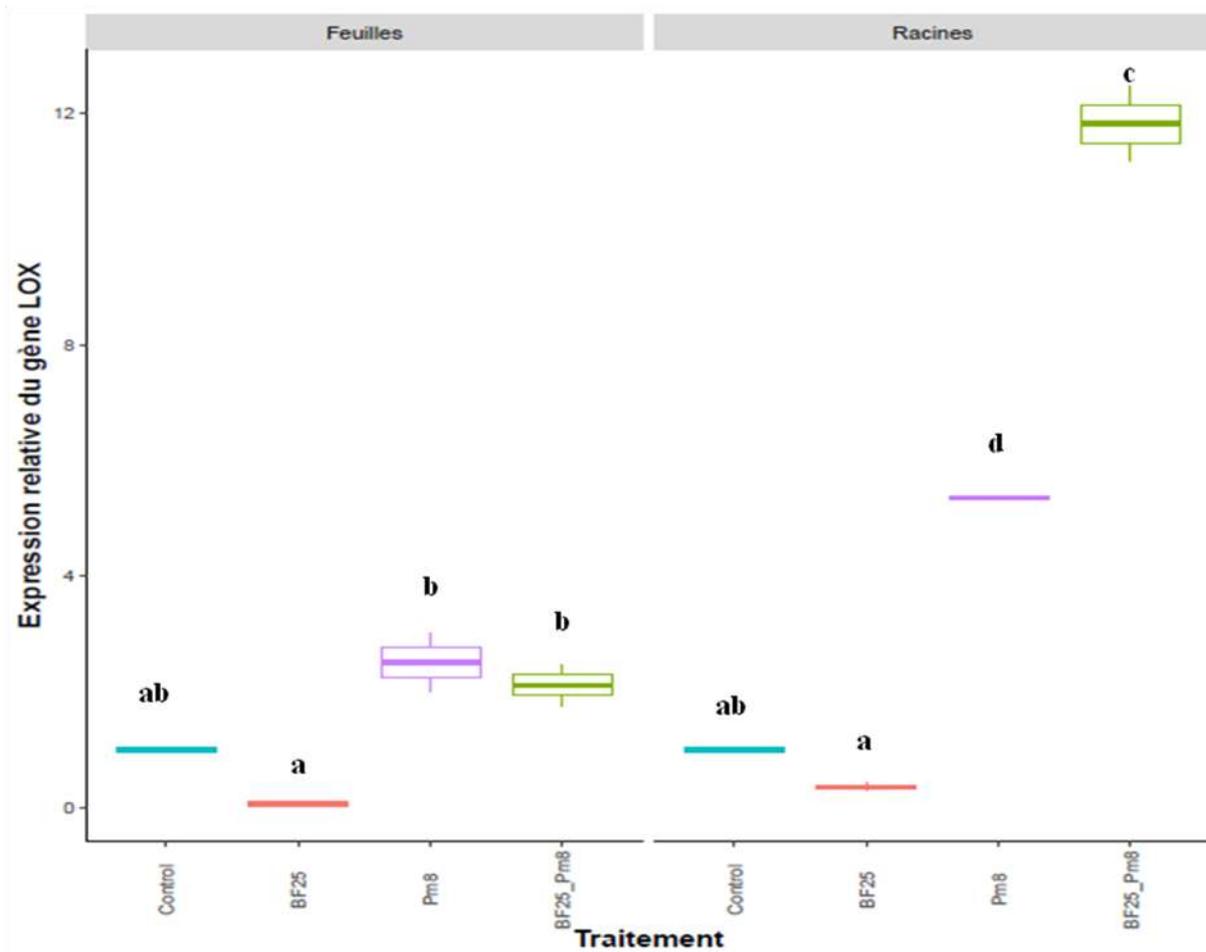
L'expression des gènes PR4, PR5 et PR10 n'a pas changé dans les feuilles et les racines des plantes seulement prétraitées par BF25 en comparaison aux plantes non prétraitées par le consortium bactérien (Figure 55, 56 et 57).

**Tableau 27.** Analyse de la variance de type III de l'expression relative des gènes LOX, Pal, PR4, PR5 et PR10 des plantes *Medicago truncatula* infectées ou pas par *Phoma medicaginis* et pré-inoculées par le consortium bactérien

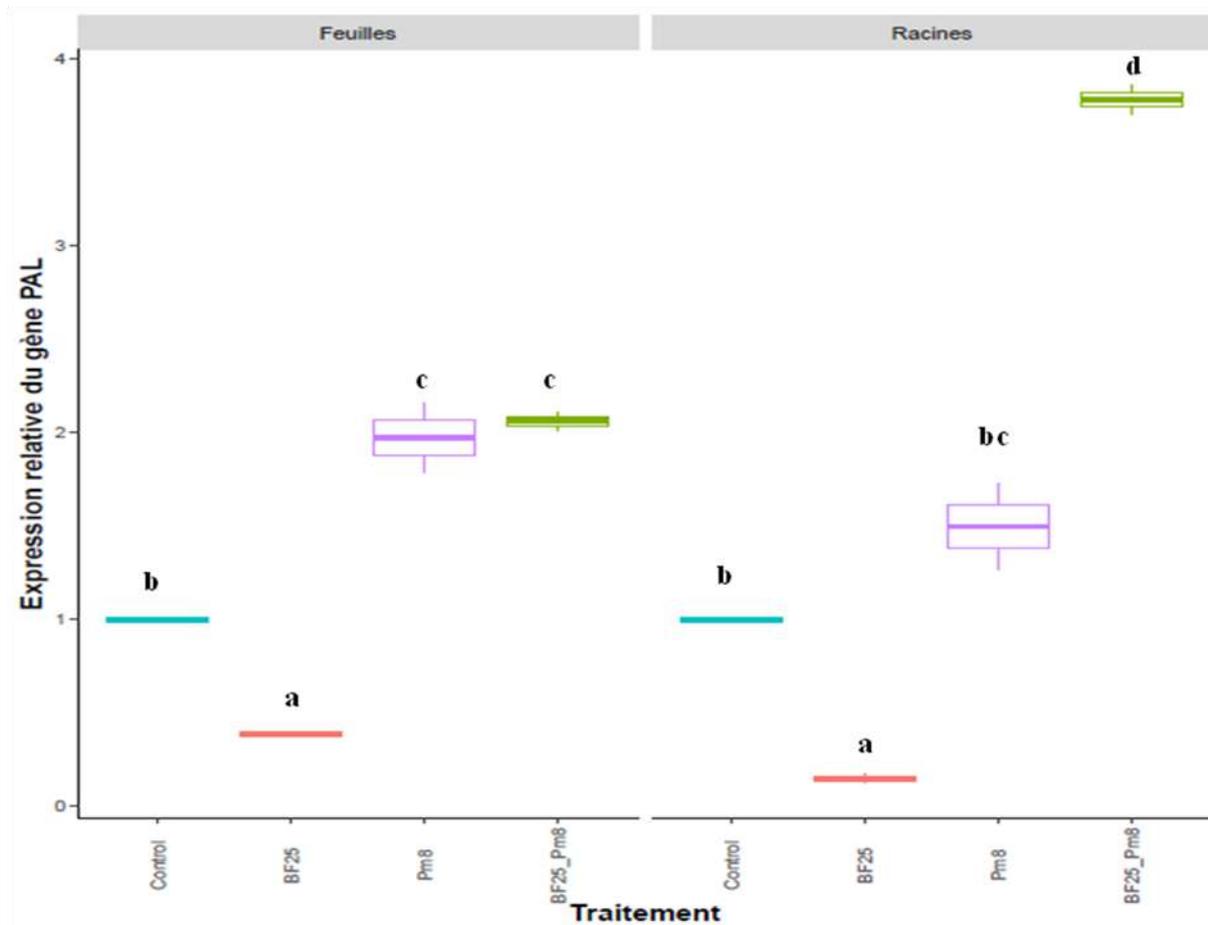
L'analyse a été réalisée sur la base de l'aire sous la courbe de l'expression relative des gènes. Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où le type de traitement, l'organe et leur interaction ont été considéré comme un effet fixe. L'expérience indépendante a été traitée comme un effet aléatoire.

Codes de signification pour P:0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

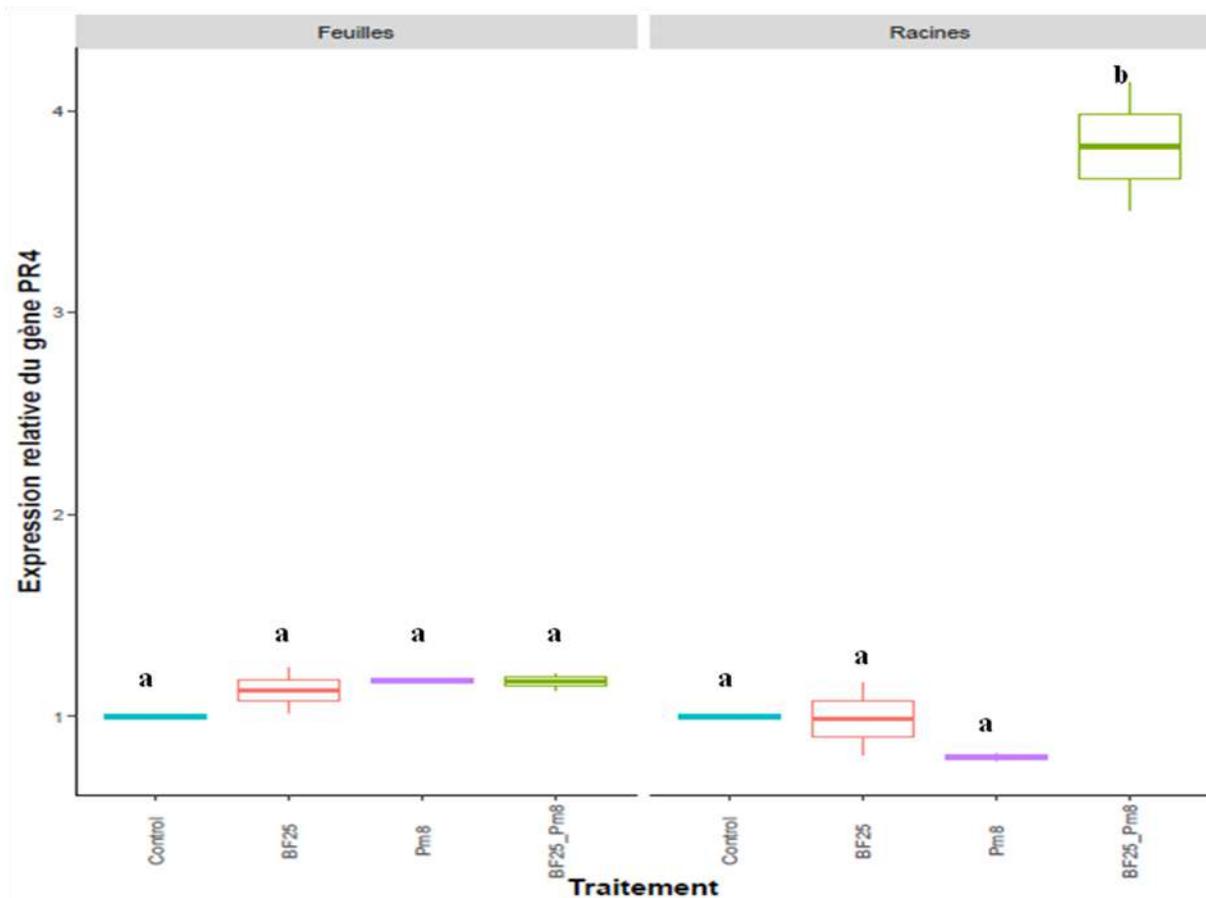
Source de variation	LOX			PAL			PR4		PR5		PR10	
	DF	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)	
<b>Traitement</b>	3	269.1	1.366e-07	257.47	1.593e-07	86.72	6.708e-06	199.970	7.342e-08	547.6	1.354e-09	
		3	***	9	***	6	***	3	***	2	***	
<b>Organe</b>	1	292.9	5.700e-07	12.777	0.009042 **	44.64	0.0002821	0.8462	0.384524	468.2	2.193e-08	
		9	***			8	***			0	***	
<b>Traitement: Organe</b>	3	144.7	1.163e-06	49.976	4.288e-05	79.42	9.039e-06	11.2704	0.003035	267.5	2.325e-08	
		7	***		***	9	***		**	6	***	



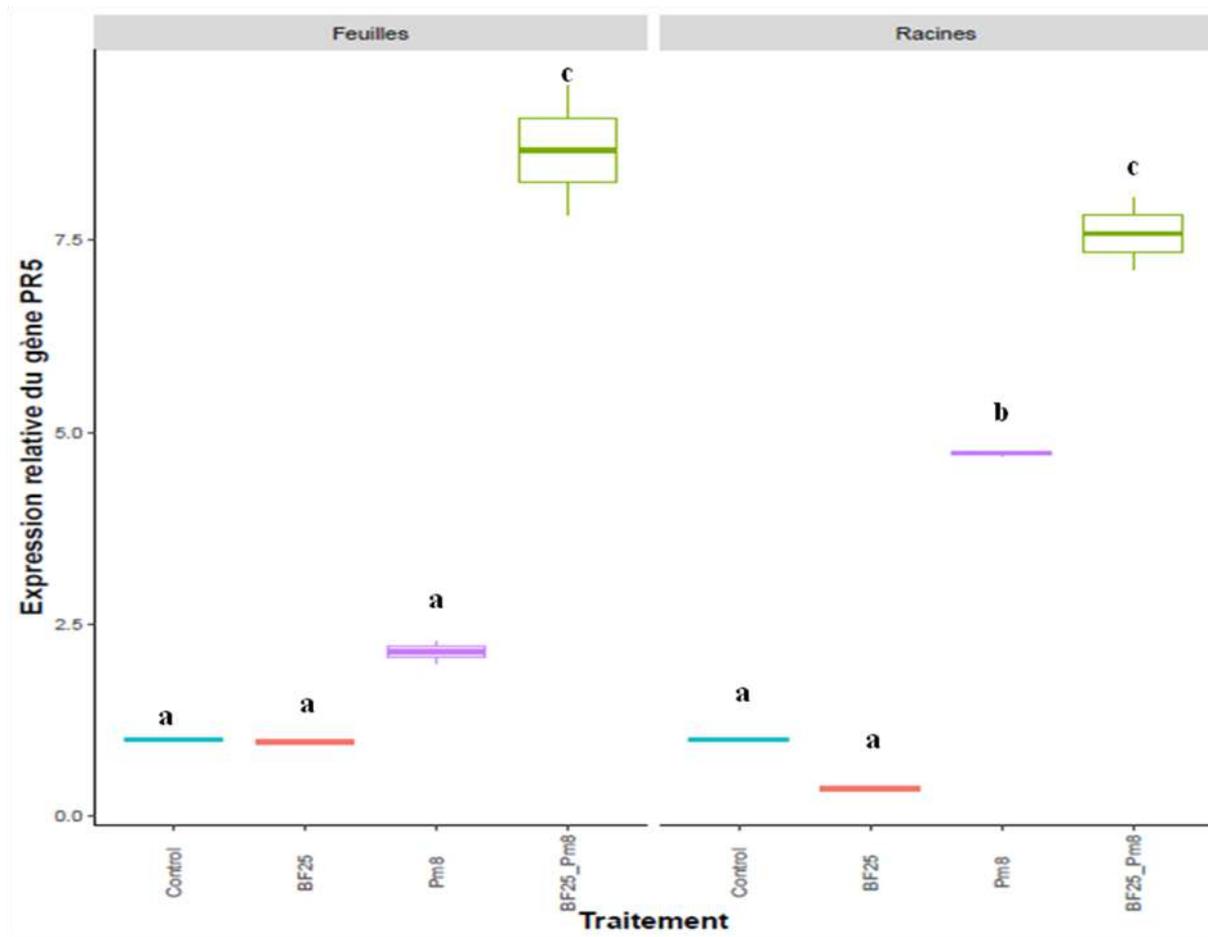
**Figure 53.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* sur l'expression relative du gène de la LOX (Lipoxygénase) dans les feuilles et les racines de la lignée A17 de *Medicago truncatula* à 24 h après l'infection par Pm8. Control : plantes non prétraitées et non infectées ; BF25 : plantes seulement prétraitées par le consortium bactérien BF25; BF25\_Pm8 : plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 ; Pm8 : plantes seulement infectées par Pm8. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



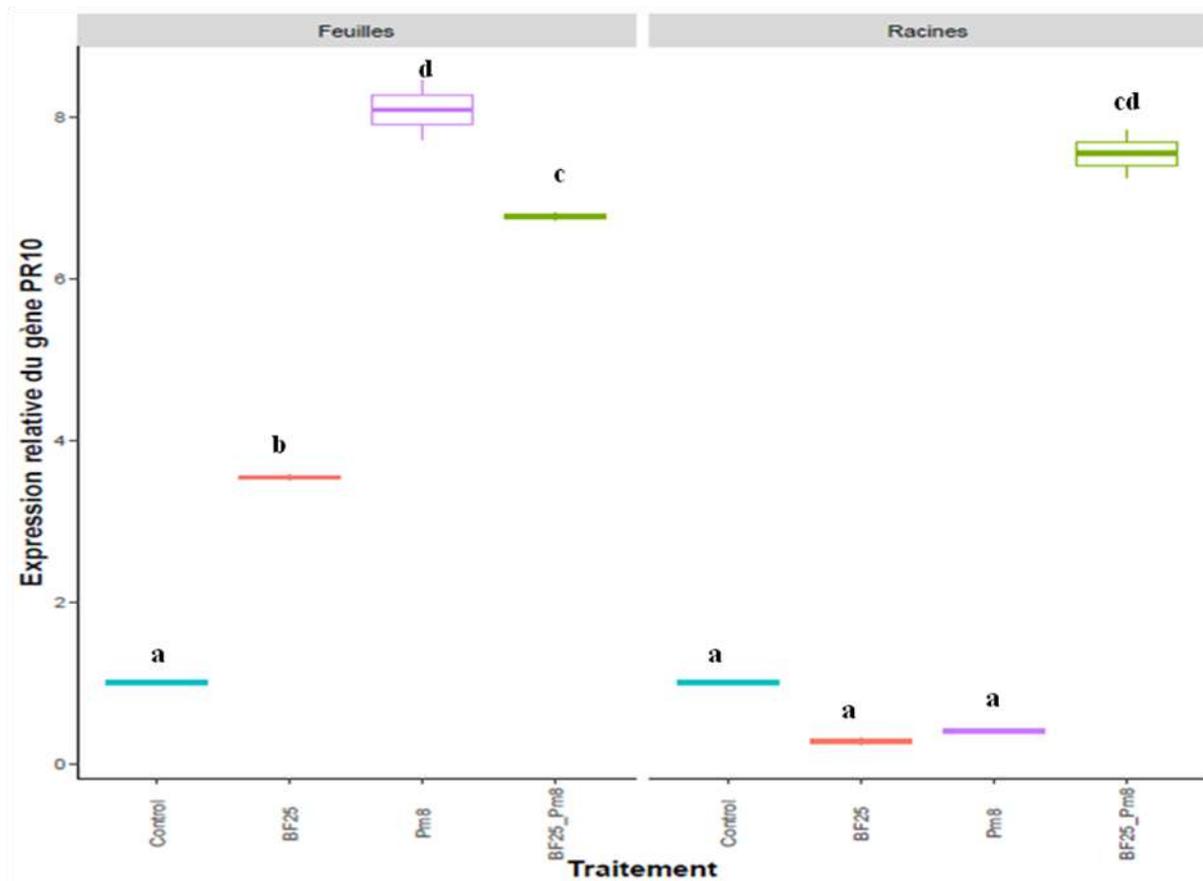
**Figure 54.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* sur l'expression relative du gène de la PAL (phénylalanine ammonia-lyase) dans les feuilles et les racines de la lignée A17 de *Medicago truncatula* à 24 h après l'infection par Pm8. Contrôle : plantes non prétraitées et non infectées ; BF25 : plantes seulement prétraitées par le consortium bactérien BF25 ; BF25\_Pm8 : plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 ; Pm8 : plantes seulement infectées par Pm8. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figure 55.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* sur l'expression relative du gène de la PR4 (pathogenesis-related protein4) dans les feuilles et les racines de la lignée A17 de *Medicago truncatula* à 24 h après l'infection par Pm8. Contrôle : plantes non prétraitées et non infectées ; BF25 : plantes seulement prétraitées par le consortium bactérien BF25 ; BF25\_Pm8 : plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 ; Pm8 : plantes seulement infectées par Pm8. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figure 56.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* sur l'expression relative du gène de la PR5 (pathogenesis-related protein5) dans les feuilles et les racines de la lignée A17 de *Medicago truncatula* à 24 h après l'infection par Pm8. Contrôle : plantes non prétraitées et non infectées ; BF25 : plantes seulement prétraitées par le consortium bactérien BF25 ; BF25\_Pm8 : plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 ; Pm8 : plantes seulement infectées par Pm8. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figure 57.** Effet du prétraitement par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Phoma medicaginis* sur l'expression relative du gène de la PR10 (pathogenesis-related protein 10) dans les feuilles et les racines de la lignée A17 de *Medicago truncatula* à 24 h après l'infection par Pm8. Contrôle : plantes non prétraitées et non infectées ; BF25 : plantes seulement prétraitées par le consortium bactérien BF25 ; BF25\_Pm8 : plantes prétraitées par BF25 et infectées par Pm8 ; Pm8 : plantes seulement infectées par Pm8. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 5. Essai de contrôle biologique *in vivo* de *Verticillium alfalfae* sur des plantes de *Medicago truncatula* par le consortium bactérien endophyte

L'effet du consortium bactérien sur la réponse des plantes de *M. truncatula* à l'infection par *V.alfalfae* a été étudié en utilisant deux paramètres d'infection à savoir l'aire sous la courbe de progression de maladie (AUDPC) et le score maximal de symptômes (MSS) et un paramètre de croissance à savoir le poids frais des feuilles (PFF). L'analyse de corrélation entre les paramètres d'infection et celui de croissance a montré que les deux paramètres d'infection sont corrélés positivement entre eux et négativement corrélés au paramètre de croissance (Figure 58).

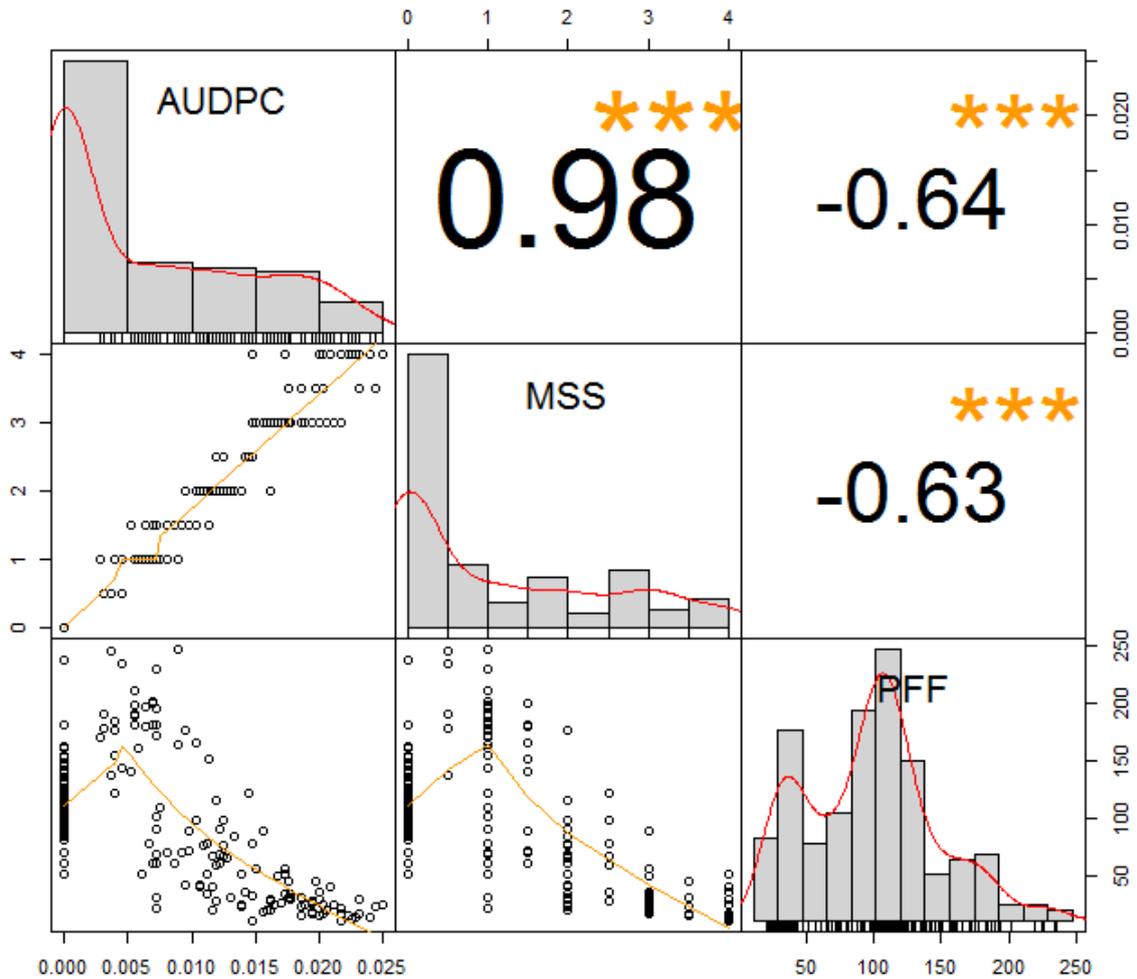
Le regroupement de différents traitements des lignées de *M.truncatula* (A17 et F38) de prétraitées ou non avec BF25 et infectées ou non avec V31.2 en fonction des valeurs des paramètres d'infection (AUDPC et MSS) et du paramètre de croissance (PFF) (Figure 59). Le cluster 1 contient les traitements controls (A17 et F38) ainsi que les traitements prétraités seulement avec BF25 qui présentent des faibles valeurs des paramètres d'infection et des moyennes valeurs de PFF; le cluster 2 contient les plantules de la lignées A17 prétraitées par BF25 et infectées par V31.2 qui présente des fortes valeurs de PFF uniquement alors que le cluster 3 contient les plantules de A17 infectées seulement avec V31.2 et qui présentent des moyennes valeurs des paramètres d'infection et de PFF. Le cluster 4 contient les plantules de la lignée F83 prétraitées par BF25 et infectées par V31.2 et les plantules de la lignée F83 infectées seulement avec V31.2 qui présentent des fortes valeurs de paramètres d'infection et de très faibles valeurs de PFF (Figure 59)

Les résultats pour le paramètre de l'aire sous la courbe de progression des symptômes de la maladie (AUDPC) basée sur la cinétique de score des symptômes de l'attaque par V31.2 des lignées A17 et F83005.5 prétraitées ou non par le consortium bactérien ont montré qu'il y a une différence significative entre les traitements chez la lignée A17 mais pas chez la lignée F83005.5 (Tableau 28). Ainsi L'AUDPC est plus élevée chez les plantes A17 infectées seulement par V31.2 par rapport aux plantes prétraitées par BF25 et infectées par V31.2 (Figure 60).

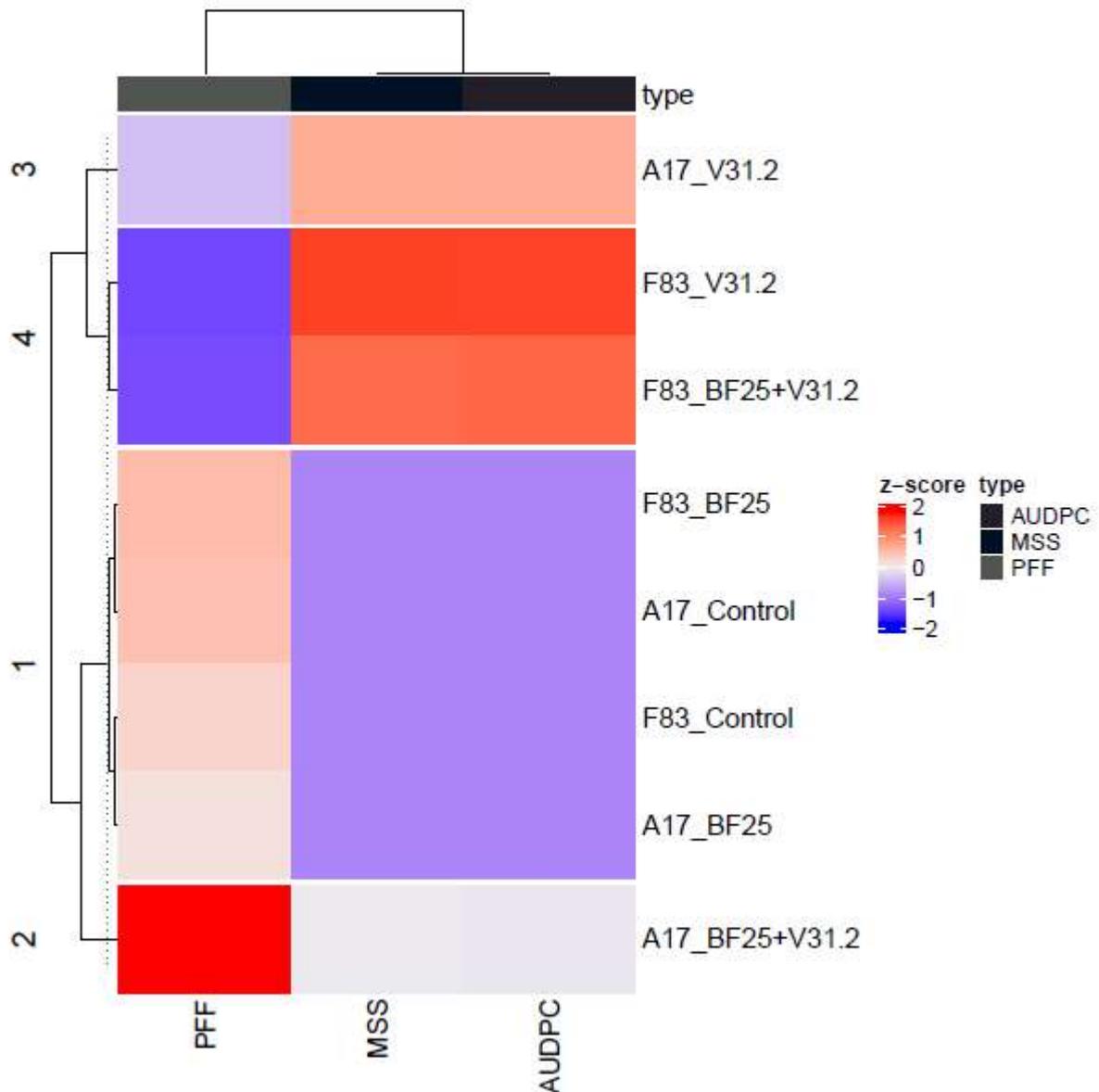
Les résultats pour le paramètre du score maximal de symptômes (MSS) d'attaque de V31.2 sur les lignées A17 et F83005.5 prétraitées ou non par le consortium bactérien BF25 ont montré qu'il y a une différence significative entre les traitements chez la lignée A17 et une différence sub-signification chez la lignée F83005.5 (Tableau 28). Le MSS est plus faible

chez les plantes A17 prétraitées par BF25 et infectées par V31.2 par rapport celles infectées seulement par V31.2 (Figure 61).

Des différences significatives pour le paramètre de croissance, poids frais des feuilles (PFF), ont été observées chez les deux lignées A17 et F83005.5 lorsque celles-ci sont prétraitées ou non par le consortium bactérien BF25 et infectées ou non par V31.2 (Tableau 28). Le PFF est plus faible chez les plantes A17 seulement infectées par V31.2 par rapport à celles prétraitées par BF25 et infectées par V31.2, à celles seulement prétraitées avec BF25 et aux plantes contrôle (non prétraitées par BF25 et non infectées par V31.2). Par contre, chez les plantes F83005.5, le PFF est plus faible chez les plantes infectées par V31.2 par rapport à celles non infectées, et ce que les plantes aient été pré-traitées ou pas avec le consortium bactérien (Figure 62).



**Figure 58.** Corrélations entre le paramètre de croissance et les paramètres d'infection mesurés sur des plantes de *Medicago truncatula* prétraitées par du consortium bactérien endophyte et infectées ou pas par *Verticillium alfalfae*. Les coefficients de corrélation de Pearson par paires sont indiqués. Les étoiles représentent des corrélations significatives selon le code de signification suivant pour les valeurs p: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1. Le graphique a été obtenu à l'aide du package psych du logiciels R.



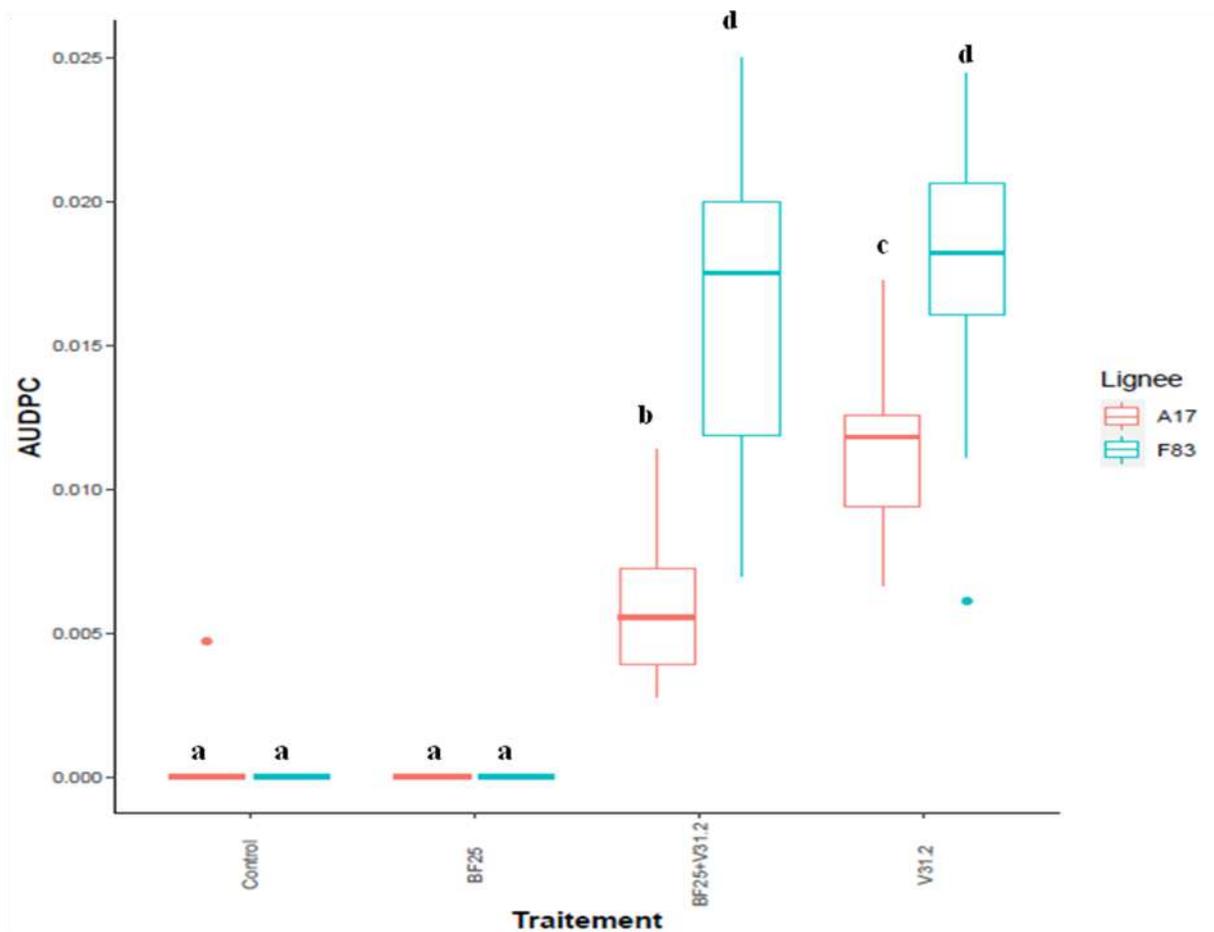
**Figure 59.** Regroupement des traitements (Heatmap) en fonction du paramètre de croissance (PFF) et d'infection (AUDPC et MSS) des lignées (A17 et F38) de *Medicago truncatula* prétraitées ou non par le consortium bactérien BF25 et infectées ou pas par *Verticillium alfalfae* (V31.2). Le regroupement hiérarchique des traitements a été calculé sur la base des corrélations de Pearson. Les scores Z ont été calculés et utilisés pour générer la Heatmap. La couleur rouge indique une activité élevée et la couleur bleue indique une faible activité. Le dendrogramme à gauche montre les traitements se regroupant en fonction de des valeurs des paramètres PFF, AUDPC et MSS (quatre groupes de 1 à 4). Le graphique a été obtenu en utilisant la fonction Heatmap du package ComplexHeatmap du logiciel R.

**Tableau 28.** Analyse de la variance de type III de l'évolution des symptômes d'infection (AUDPC) du Score Maximal de Symptôme (MSS) et du Poids Frais des Feuilles (PFF) des plantes de *Medicago truncatula* infectées *Verticillium alfalfae* prétraitées par le consortium bactérien BF25.

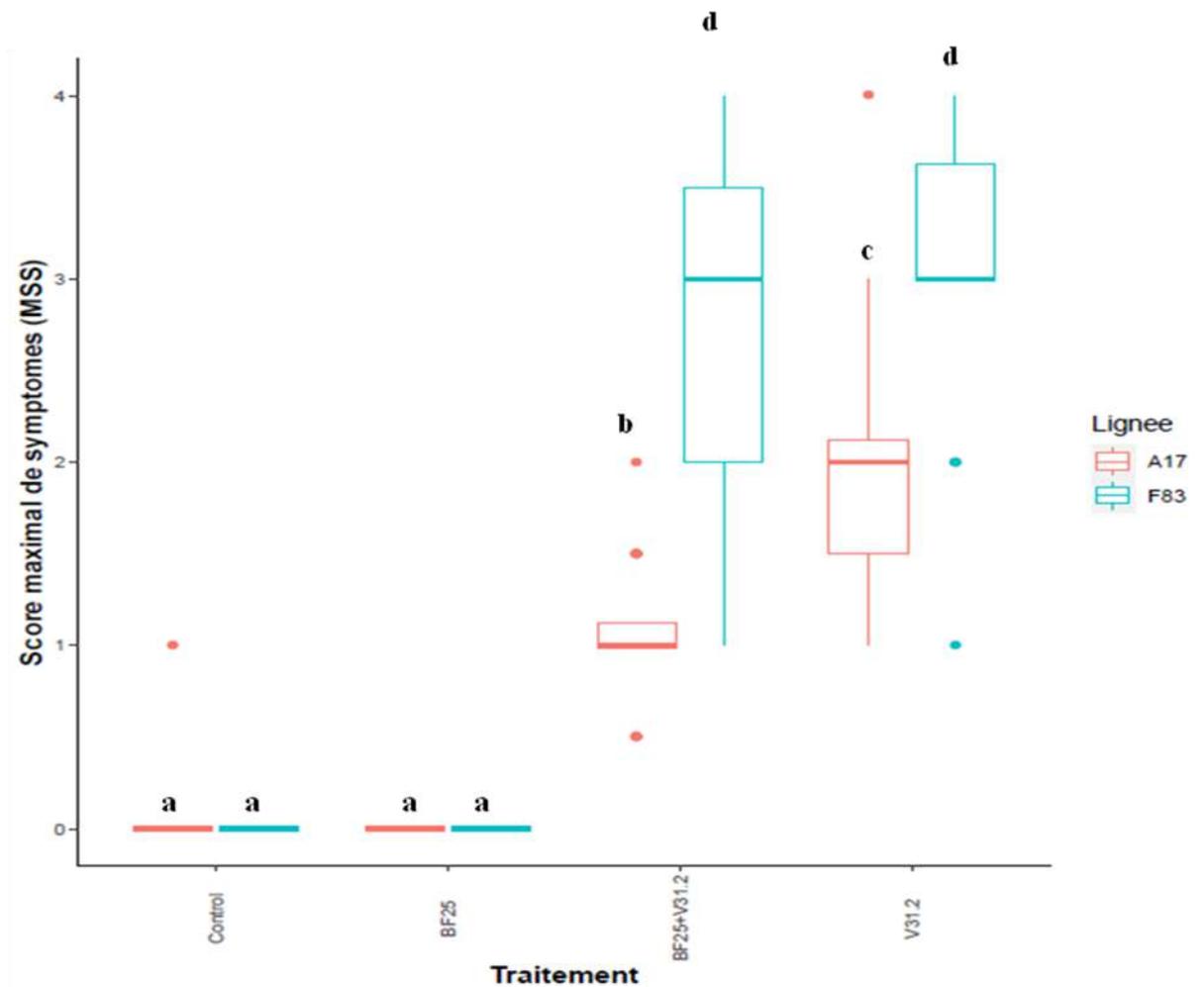
Les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte où le traitement, la lignée et leur interaction ont été considéré comme un effet fixe et l'expérience indépendante a été traité comme un effet aléatoire.

Signification du Code pour P : 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

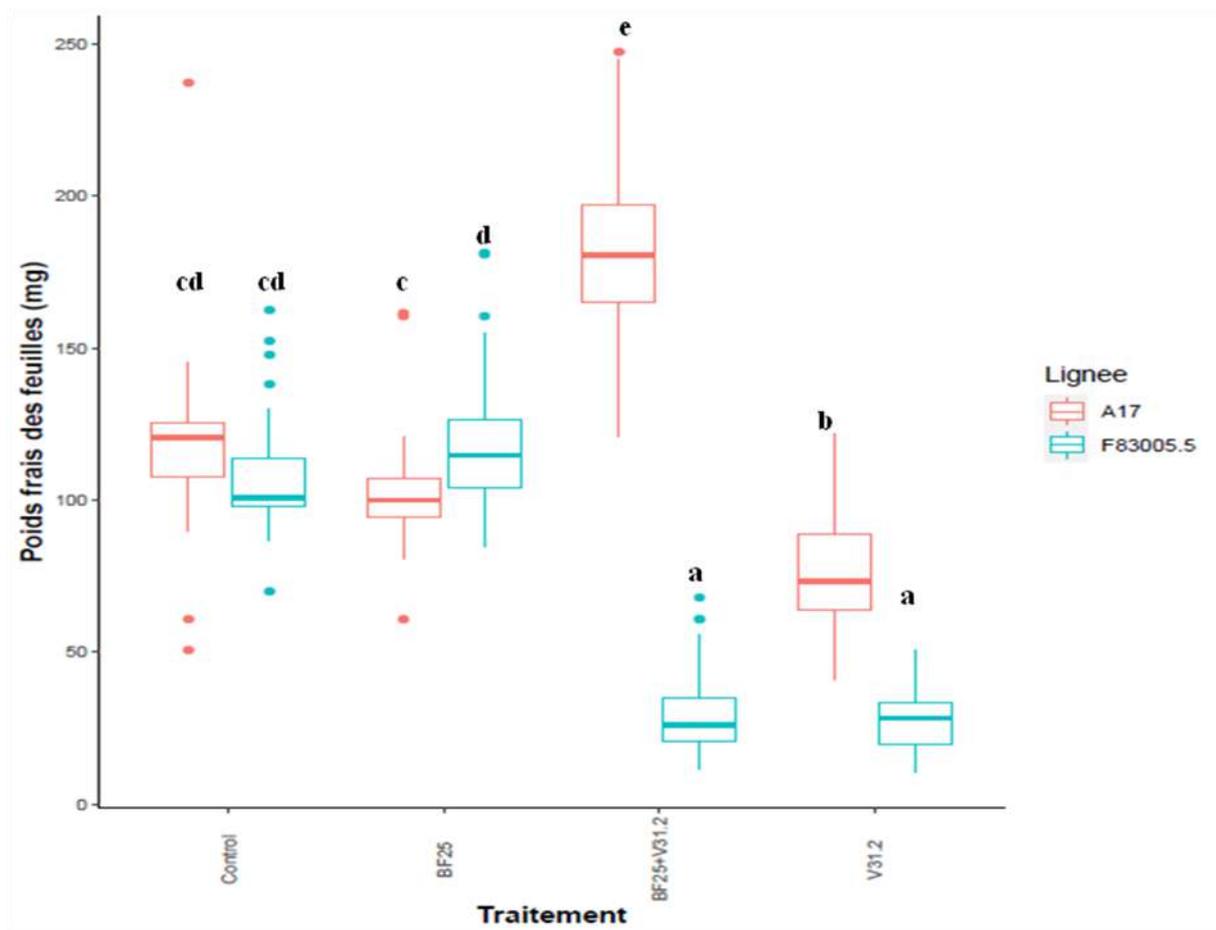
Source de variation	AUDPC			MSS		PFF	
	D	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)
<b>Traitement</b>	3	540.50	< 2.2e-16	429.78	< 2.2e-16	126.1	< 2.2e-16
		9	***	4	***	8	***
<b>Lignée</b>	1	162.88	< 2.2e-16	122.38	< 2.2e-16	341.4	< 2.2e-16
		4	***	0	***	1	***
<b>Traitement:</b>	3	61.178	< 2.2e-16	45.634	< 2.2e-16	208.9	< 2.2e-16
<b>Lignée</b>			***		***	0	***



**Figure 60.** Effet de prétraitement des plantes de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) par le consortium bactérien BF25 sur l'évolution des symptômes d'infection de *Verticillium alfalfae*. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ). V31.2 : plantes seulement infectées par la souche V31.2 de *V. alfalfae* ; BF25+V31.2 : plantes prétraitées par le consortium BF25 et infectées par V31.2.



**Figure 61.** Effet de prétraitement des plantes de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) par le consortium bactérien BF25 sur l'évolution du score maximal de symptômes de *Verticillium alfalfae*. Les lettres indiquent des différences significatives tel que révélé par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ). V31.2 : plantes infectées seulement par la souche V31.2 de *V. alfalfae* ; BF25+V31.2 : plantes prétraitées par le consortium BF25 et infectées par V31.2.



**Figure 62.** Effet de prétraitement des plantes de *Medicago truncatula* (A17 et F83005.5) par le consortium bactérien BF25 et de l'infection par *Verticillium alfalfae* sur le poids frais des feuilles. Les lettres indiquent des différences significatives telles que révélées par le test de Tukey ( $P < 0,05$ ). Control : plantes non prétraitées avec BF25 et non infectées par V31.2 ; BF25 : plantes seulement prétraitées avec BF25 ; V31.2 : plantes seulement infectées par la souche V31.2 de *V. alfalfae* ; BF25+V31.2 : plantes prétraitées par le consortium BF25 et infectées par V31.2.



Les fongicides synthétiques sont utilisés pour lutter contre les maladies avec un coût global supérieur à 1 milliard de dollars (Hua et al., 2018) et un impact négatif sur l'environnement et la santé humaine. Par conséquent, il est nécessaire de développer des méthodes de protection pré-et post-récolte des cultures avec des produits non toxiques, qui sont respectueux de l'environnement et également de la santé animale et humaine, comme le biocontrôle par les endophytes. Les bactéries endophytes ont attiré l'attention en raison de leurs activités visant à promouvoir la croissance des plantes et les stratégies de lutte biologique qui peuvent être appliquées soit en pré-récolte ou en post-récolte du fruit ou du légume.

Dans une première partie de cette étude, nous avons visé à sélectionner des souches de bactéries endophytes efficaces pour contrôler l'infection par *Botrytis cinerea* sur les fruits de tomates en post-récolte. Cet agent pathogène est considéré comme l'un des plus importants en termes de pertes économiques engendrées pour le secteur agricole dans le monde (Dean et al., 2012; Jin and Wu, 2015). La sélection des bactéries endophytes a été faite en fonction de leur activité antifongique et en tenant compte de leur effet sur la germination des graines et la croissance des plantules de tomate.

Un total de 50 souches bactériennes endophytes a été isolé à partir d'organes aériens et racinaires de plantes de tomates saines dans six localités de la région de la péninsule tunisienne du Cap Bon. Malgré la proximité entre les localités prospectées (<53 km), une différence importante en terme de nombre et d'espèces de souches de bactéries endophytes a été observée. Ces différences substantielles dans les communautés bactériennes endophytes, à une petite échelle géographique, peuvent s'expliquer par la différence dans la composition du sol et le système de culture de l'exploitation (Vos and Velicer, 2006; Vos et al., 2013). Au niveau des organes végétaux, les résultats ont montré une dominance des souches de bactéries isolées à partir des feuilles de tomate par rapport aux autres organes. Un tel résultat peut être lié à la faculté connue des endophytes de migrer des racines vers les organes supérieurs de la plante pour atteindre les feuilles (Bodenhausen et al., 2013; Rekosz-Burlaga et al., 2014). La colonisation abondante des feuilles peut indiquer la contribution de ces microorganismes à l'efficacité de la photosynthèse et/ou à la protection de ces organes vitaux contre les maladies. En effet, plusieurs travaux démontrent l'action bénéfique des microorganismes endophytes sur la photosynthèse en augmentant la teneur en chlorophylle, l'efficacité photochimique ou le taux net d'assimilation du CO<sub>2</sub> (Rho et Kim, 2017; Mnasri et al., 2017) ainsi que leurs propriétés de protection contre les agents pathogènes (Pavithra et al., 2020). Les tests

d'antagonisme *invitro* contre *B. cinerea* via les COV bactériens ont montré que 18 souches de bactéries de la collection produisent des COV ayant une activité antifongique. Comme en témoigne le séquençage de l'ARNr 16S, celles-ci appartiennent à différentes espèces de genres *Bacillus* et *Enterobacter* avec un enrichissement significatif en souches du genre *Bacillus*. Les souches de *Bacillus* colonisant les plantes sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et de tolérance au stress en améliorant la croissance et la santé des plantes (Earl et al., 2008 ; Mnasri et al., 2017). Dans cette étude, la majorité des souches antagonistes de *Bacillus* identifiées ont montré un effet neutre à promoteur sur la germination des graines de tomates ou la croissance des plantules, ce qui indique leur rôle potentiel dans l'amélioration de la croissance de la tomate et la protection contre *Botrytis*. Le genre *Bacillus* est déjà connu pour abriter de puissantes souches antagonistes aux agents pathogènes des plantes assurant une protection efficace des plantes grâce à la production de composés organiques volatils (Kefi et al., 2015; Mnasri et al., 2017; Jiang et al., 2018) ainsi que des composés solubles tels que les lipopeptides et les enzymes hydrolytiques (Ben Slimene et al., 2012; Slimene et al., 2015). À notre connaissance, il s'agit du premier rapport d'activité antifongique des COV contre *B. cinerea* produit par *B. nakamurai*, *B. pseudomycooides*, *B. proteolyticus*, *B. thuringiensis*, ainsi que *E. asburiae* et *E. cloacae*. Néanmoins, des espèces de *Bacillus* comme *B. amyloliquefaciens* (Gotor-Vila et al., 2017), *B. velezensis* (Gao et al., 2017; Jiang et al., 2018), *B. subtilis* (Gao et al., 2018; Zhao et al., 2019), *B. vallismortis* (Li et al., 2019) et *B. toyonensis* (Contreras-Pérez et al., 2019) sont connues pour produire des COV antifongiques contre plusieurs phytopathogènes dont *B. cinerea*. Les espèces endophytes isolées d'*Enterobacter* (*E. asburiae* et *E. cloacae*) ont produit des COV antifongiques contre *B. cinerea*. Diverses espèces d'*Enterobacter* sont connues pour coloniser les tissus internes des plantes, améliorer la croissance des plantes et prévenir les attaques d'agents pathogènes (Jha et al., 2011; Latha et al., 2019; Singh et al., 2020). Des études antérieures ont montré que les souches d'*E. Asburiae*KDKS5-49 et Vt-7 produisent des COV antifongiques contre *Phytophthora capsici* (Toh et al., 2016) et *Aspergillus flavus*(Gong et al., 2019), respectivement. *Enterobacter cloacae* a une activité antifongique contre plusieurs agents pathogènes tels que *Fusarium oxysporum f. sp. spinaciae* (Tsuda et al., 2001), *Mycosphaerella fijiensis* (Macedo Raygoza et al., 2019), *Sclerotium rolfsii* (Mahartha and Suprpta, 2018) et *Phytophthora sojae* ( Zhao et al., 2018).

Aucune corrélation significative entre les activités antifongiques et PGP médiée par les COV n'a été mise en évidence. Deux hypothèses peuvent être faites: (i) la première hypothèse

est que notre résultat est en faveur de la spécialisation des bactéries endophytes vers l'antagonisme ou les activités de PGP; (ii) la seconde, c'est que le protocole utilisé (double culture assay) a peut-être favorisé la sélection de souches antagonistes au détriment des souches PGP en raison de la forte concentration des COV. La première hypothèse est supportée par les travaux de Walitang et al. (2017) qui ont montré que des souches isolées à partir de différents cultivars de riz ont des caractéristiques distinctes montrant une certaine spécificité dans leurs activités. Par exemple, les souches de *Flavobacterium sp.* sont des solubilisants de phosphate et des producteurs d'acide indole-3-acétique, tandis que *Pseudomonas sp.* et *Xanthomonas sp.* ont une activité pectinase et cellulase très élevée (Walitang et al., 2017). La seconde hypothèse est supportée par les travaux d'Asari et al. (2016) indiquant que l'activité promotrice et antagoniste des plantes par les COV dépend de la dose: alors que l'activité PGP nécessite une faible concentration de volatils, l'activité antagoniste est favorisée par une concentration élevée de ces composés. Au niveau pratique, la spécialisation observée dans les activités biologiques des bactéries endophytes constitue un défi pour le développement de bio-inocula à large spectre à usage agricole. Ce problème peut être géré en développant des inocula contenant un consortium de souches de bactéries compatibles avec des activités biologiques complémentaires comme indiqué dans des travaux antérieurs (Thakkar and Saraf, 2015; Palmieri et al., 2017; Taha et al., 2019).

Sur la base de ces résultats, nous avons sélectionné des souches de bactéries endophytes qui ont de fortes activités antifongiques COV et ayant autant que possible un effet PGP sur la germination des graines et la croissance des plantules de tomates. Quatre souches de *Bacillus* (BF11, DHT2, H1F1 et H2F12) et une souche d'*Enterobacter* (TR1) ont été sélectionnées et utilisées pour le contrôle post-récolte de *B. cinerea* sur des tomates en utilisant leurs COV et leurs cellules végétatives. Les activités de cellulase, de pectinase, d'amylase, de phytase, de xylanase et de chitinase ont été mises en évidence dans presque toutes les souches de bactéries endophytes sélectionnées. De telles activités enzymatiques constituent des caractéristiques importantes pour les endophytes pour la colonisation des tissus végétaux. Ces endophytes bactériens ont également montré des activités enzymatiques PGP prometteuses, y compris la production d'ammoniac et de sidérophores et la solubilisation du phosphate. Les souches de *Bacillus* sélectionnées ont réduit de manière significative la pourriture des fruits causée par *B. cinerea* par leurs cellules végétatives probablement en raison de leur capacité à produire plusieurs enzymes hydrolytiques comme indiqué ci-dessus. Selon Essghaier et al. (2009), le contrôle biologique de *B. cinerea* sur les fraises est corrélé à la production d'enzymes

hydrolytiques (chitinase, cellulose, protéase,  $\beta$ -1,3 glucanase) par *Bacillus spp.*(souche 1502). De plus, Zhang et al.(2010) ont montré que la production de glucanase, de chitinase et de protéases par la souche PL5 d'*Aureobasidium pullulans* réduit l'infection en post-récolte de *Monilinia laxa* chez la pomme et la pêche. En comparaison aux souches sélectionnées de *Bacillus*, la souche *Enterobacter* TR1 a montré l'effet le plus protecteur contre la pourriture de *B. cinerea* sur les fruits de tomate grâce aux COV qu'elle produit. En tant que spécimen clinique potentiel, cette souche ne peut pas être appliquée directement sur les plantes, mais les COVs bioactifs qu'elle émet peuvent être utilisés pour la lutte biologique contre la moisissure grise et potentiellement testés contre d'autres champignons en post-récolte.

L'identification par GC-MS des COVs bactériens a montré un ensemble de sept composés communs produits par les cinq souches de bactéries endophytes antifongiques sélectionnées, à savoir le 1-octyn-3-ol, 4-éthyle; le  $\beta$ -fenchol; le benzène, m-di-tertbutyle; la 2-Undécanone; la 3,3,5 triméthylbicyclo [3.3.0] octan-2,8-dione; la 2- Pentadécane, 6,10,14 triméthyl et un composé non identifié. Ces COVs peuvent être impliqués dans des processus biologiques vitaux chez les bactéries tels que la communication, l'adaptation environnementale et la défense contre d'autres microbes (Chernin et al., 2013 ;Audrain et al., 2015). En effet, les volatils du groupe cétone comme la 2-Undécanone sont synthétisés par différents genres de bactéries et sont connus pour leur activité antibactérienne (Melkina et al., 2017 ;Veselova et al., 2019). Certaines souches de bactéries telles que TR1 et DHT2 émettent des composés contenant du soufre, y compris le disulfure de diméthyle et le trisulfure de diméthyle connus pour leurs activités antifongiques contre plusieurs agents pathogènes dont les oomycètes tels que *Pythium myriotylum* et *Phytophthora capsici* (Agisha et al., 2019) et les champignons tels que *Rhizoctonia solani*, *Athelia rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe oryzae*, *Gibberella moniliformis* et *B. cinerea* (Elkahoui et al., 2015; Hernández-León et al., 2015 ; Agisha et al., 2019). Les souches DHT2 et H1F1 produisent du cyclohexanol, du 4 méthyle et du 2-heptanone, 6-méthyle qui sont rapportés pour leurs activités antifongiques chez *Bacillus spp.* (Morita et al., 2019). Les souches TR1 et H2F12 produisent la 2-heptanone qui est connue pour ces activités insecticides et antifongiques particulièrement contre *Pythium irrégulier*, *R. solani* et *F. oxysporum* (Cole and Blum, 1975) et a été également liée à l'activité antifongique de *B. amyloliquefaciens* DA12 contre les espèces *Fusarium* (Lee et al., 2017). La souche H2F12 produit sept substances volatiles spécifiques avec le Dodécane comme composé majeur; celui-ci a des activités antifongiques (*R. solani* et *Bipolaris oryzae*) et antibactériennes (*Xanthomonas oryzae*) en tant que composé

pur (Chanprapai et al., 2018) et est également lié à l'antagonisme bactérien endophytique (Kai et al., 2007; Li et al., 2015). Les souches H1F1 et BF11 produisent trois et six COVs spécifiques, respectivement d'activité antimicrobienne inconnue; suggérant qu'ils pourraient être de nouveaux COVs bioactifs pour le contrôle de *B. cinerea*. Une analyse plus approfondie doit être effectuée pour identifier ces composés volatils et étudier leurs activités antifongiques. La souche *Enterobacter* TR1 qui a l'effet protecteur le plus important *in vivo* contre la pourriture de *B. cinerea* sur les fruits de tomate produit au total 57 COV (à 7 et 14 j) dont deux (le 3-méthylbutan-1-ol et le 2-furanméthanol) sont considérés comme biomarqueurs d'*E. cloacae* (Lawal et al., 2018) et trois composés (le 3-méthylbutan-1-ol, le pentadécane et la 2-octanone) précédemment signalés pour leurs activités antifongiques (Li et al., 2020). Cette étude a montré une activité antifongique notable du principal composé volatil 3-méthylbutan-1-ol produit par la souche TR1 qui supprime totalement l'infection par *B. cinerea* à 0,442 mL L<sup>-1</sup> sans altération visible sur les fruits de tomate. Calvo et al. (2020) ont également montré que le 3-méthylbutan-1-ol a une activité antifongique contre *B. cinerea* à 0,1 mL L<sup>-1</sup> dans les raisins de table. La différence entre l'efficacité de l'activité antifongique du 3-méthylbutan-1-ol dans cette étude par rapport à Calvo et al. (2020) peut s'expliquer en partie par la différence de réaction des souches de *B. cinerea* utilisées. Ceci est corroboré par le fait que nous avons observé une différence significative entre la sensibilité des souches S2 et S5 de *B. cinerea* en réaction au 3-méthylbutan-1-ol. Ainsi, avant l'application de ce composé antifongique volatil potentiel, il est crucial de déterminer non seulement la dose active mais aussi son spectre d'activité contre différentes souches fongiques, la phytotoxicité sur diverses espèces de fruits et les effets sur la qualité des fruits.

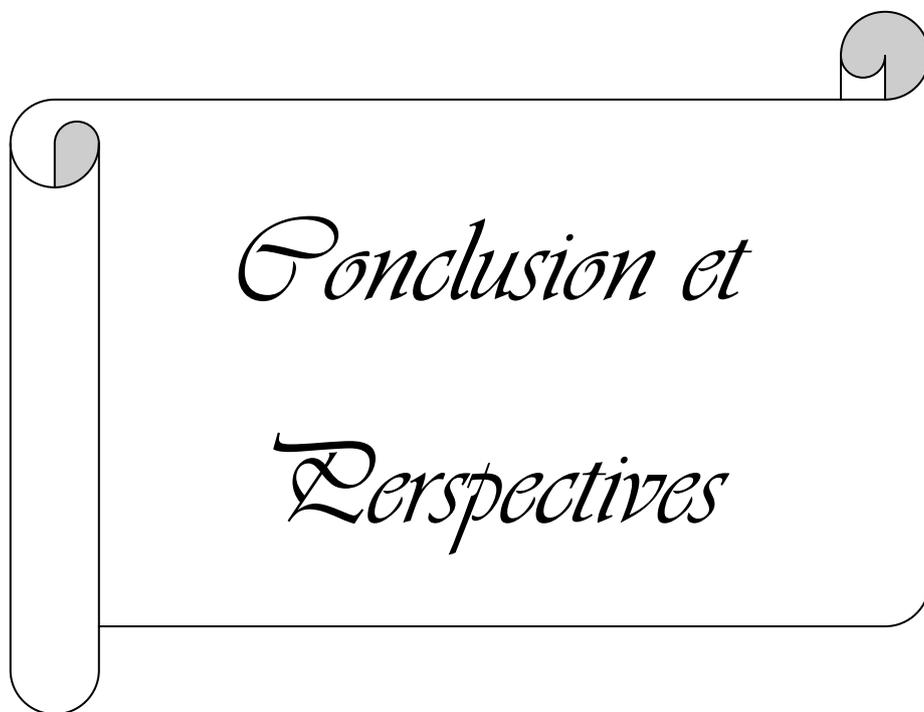
Dans la seconde partie de ce travail, nous avons mené une étude chez la plante modèle *Medicago truncatula* pour évaluer l'effet bio-protecteur en pré-récolte de consortia bactériens endophytes contre *Phoma medicaginis*, l'agent de la tige noire, et *Verticillium alfalfae*, responsable de la verticilliose. L'utilisation des consortia bactériens peut être la solution pour avoir des inocula biologiques plus efficaces pour le traitement des maladies des plantes comme décrit dans des études antérieures (Thakkar et Saraf, 2015; Palmieri et al., 2017; Taha et al., 2019).

Un total de 976 souches bactériennes endophytes a été isolé à partir d'organes aériens des plants de luzerne annuelle de quatre localités du Nord tunisien. Ces quatre sites présentent des différences dans la salinité des sols, avec deux sites salins (Ennfidha et Soliman) et deux sites non salins (Bulla-Regia et Elkef). A notre connaissance, c'est le premier rapport qui étudie la constitution bactérienne endophytes de *M. truncatula* dans des sols salins et non salins en Tunisie. Une différence importante en termes de nombre et d'espèces de souches de bactéries endophytes a été observée, la diversité et l'abondance des bactéries endophytes isolées des plantes originaires des sites salins étant significativement plus élevées que celles issues des sols non salins. Ceci est en accord avec les résultats décrits par Pirhadi et al. (2018) montrant qu'une gravité élevée du stress salin augmente la diversité dans les communautés bactériennes. Vu le nombre important des souches isolées, nous avons eu l'idée de reconstituer le microbiote de chaque organe de chaque plante collectée sur chaque site en faisant l'hypothèse que le microbiote était l'unité biologique fonctionnelle menant à une bio-protection efficace, les souches présentes au sein d'un même microbiote pouvant agir en synergie pour produire un « effet cocktail ». Plusieurs études antérieures ont montré la valeur ajoutée potentielle de l'association de souches bactériennes, qui conduit à une protection plus forte et plus cohérente que celle obtenue avec une seule souche (Thakkar et Saraf, 2015; Palmieri et al., 2017; De Vrieze et al., 2018; Taha et al., 2019). La reconstitution des microbiotes bactériens endophytes a abouti à la formation de 160 consortia. Les tests d'antagonismes des consortia bactériens reconstitués contre *P. medicaginis* (souche Pm8) et *V. alfalfae* (souche V31.2) ont montré que les cellules végétatives des consortia sont plus efficaces que leurs filtrats contre les deux souches fongiques. Plus de 90% des consortia ont eu un effet inhibiteur sur la croissance de *P. medicaginis* et de *V. alfalfae* par antagonisme direct des cellules bactériennes végétatives. Des résultats similaires d'activité antifongique de consortia bactériens sur différents phytopathogènes tels que *Fusarium sp.* (Palmieri et al., 2016; Akhtar et al., 2018), *Phytophthora infestans* (De Vrieze et al., 2018) et *R. solani* (Selim et

al., 2017) ont été précédemment décrits. Pour déterminer le mécanisme d'action des consortia bactériens, nous avons sélectionné le consortium le plus actif *invitro* sur les deux phytopathogènes pour tester *invivo* son activité de protection des plantes de *M.truncatula* contre les deux agents phytopathogènes. Le consortium BF25 est composé de quatre souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* (deux souches de *Bacillus thurengiensis*, une souche de *Bacillus subtilis* et une souche de *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*). Le genre *Bacillus* est largement décrit dans la littérature pour son utilisation dans la lutte biologique vu sa production de composés antifongiques comme les lipopeptides et les enzymes hydrolytiques. Pour l'inoculation des plantes par le consortium bactérien nous avons utilisé la méthode « bio-priming » qui consiste à enrober les graines de deux lignées de *M.truncatula* (A17 et F83005.5) par la suspension du consortium sélectionné BF25. Le bioprimering des semences est ciblé car il assure l'entrée des bactéries endophytes dans les côtés tout en évitant l'effet de la température élevée. Le traitement par bioprimering est potentiellement capable de favoriser une germination rapide et uniforme ainsi qu'une meilleure croissance des plantes. Le bioprimering avec des bactéries rhizosphériques a été signalé dans des cultures telles que la carotte, le maïs sucré. En cas d'efficacité et de survie des agents biologiques, l'amorçage a été signalé comme bénéfique et il a été rapporté qu'il améliore la croissance et le rendement des plantes (Mahmood et al., 2016). Les résultats ont montré que le prétraitement des plantes par BF25 n'avait pas d'effets bénéfiques sur la croissance des plantes des deux lignées et ce, quel que soit le paramètre de croissance considéré. Pourtant, un tel pouvoir promoteur de croissance de plantes par les consortia endophytes a été démontré pour les plantes de coton prétraitées par le consortium bactérien formé par *Stenotrophomonas maltophila H8*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis H18* (Selim et al.2017) ainsi que pour les plantes de maïs (Akhtar et al., 2018). Le pré-traitement par le consortium BF25 permet de réduire de manière significative le taux d'infection par *P. medicaginis* et *Verticillium alfalfae*. Cependant, cet effet constaté du consortium sur la réponse de la plante à l'infection par le pathogène dépend de la lignée de la plante et du paramètre de maladie mesuré (brunissement des racines ou score des pycnides, AUDPC ou MSS). L'interaction lignéeXTraitement très claire, notamment pour la protection contre la verticilliose, reflète peut être l'adaptation des consortia à leur plante hôte et aux agents pathogènes responsables de maladies de ces plantes (De Vrieze et al., 2018). De plus, les expériences de bioprotection des plantes menées *invivo* par pré-traitement avec le consortium BF25 ont été réalisées suite à un screening *invitro* pour le choix de ce consortium le plus actif en termes d'inhibition de la croissance mycélienne des deux agents pathogènes, ce qui pourrait ne pas refléter nécessairement le véritable potentiel

antagoniste du consortium dans la plante. Une autre hypothèse basée sur le fait qu'un génotype donné recrute spécifiquement des microorganismes bénéfiques face à l'attaque d'un agent pathogène particulier pourrait aussi être avancée, comme l'a récemment expliqué Berendsen et al. (2018). Pour étudier les mécanismes d'action du consortium actif BF25 lors de l'infection de *M.truncatula* par Pm8, nous avons étudié l'expression de quelques gènes des voies de défense des plantes dans les racines et les feuilles de plantules de la lignée A17 de *M.truncatula* prétraitées ou non par BF25 et infectées ou non par *P.medicaginis*. Les gènes LOX et PAL intervenant dans la voie de défenses impliquant JA/ET et les gènes PRs (PR4, PR5 et PR10) intervenant dans la voie de défense de SA ont été étudiés. Les résultats ont montré que pour tous les gènes étudiés, l'expression a été plus élevée dans les racines de plantes prétraitées par BF25 et inoculées par Pm8 par rapport à celles non-prétraitées et infectées. Pour le gène PAL, des résultats similaires ont été obtenus chez des plantes de *Polianthes tuberosa* L. traitées avec le mélange Tv1 et Bs10 et infectées par *Lasiodiplodia theobromae* (Balthazar et al., 2020). Le gène PAL code pour une phénylalanine ammoniac-lyase qui catalyse la première étape de la biosynthèse des phénylpropanoïdes. Les phénylpropanoïdes sont des précurseurs de métabolites secondaires complexes tels que les pigments flavonoïdes, les phytoalexines antimicrobiens et la lignine qui renforce les parois cellulaires. Le gène PAL a été l'un des premiers gènes de défense des plantes identifiés qui est induit par des éliciteurs microbiens (Balthazar et al., 2020). Il en est de même pour le deuxième gène de cette voie, le gène LOX qui a été fortement exprimé dans les racines de riz prétraitées *Cladosporium cladosporioides* C24G et infectées par *Magnaporthe oryzae* (Chaibub et al., 2020). Ce gène code pour la lipoxigénase, l'enzyme qui initie la biosynthèse de l'acide jasmonique, une phytohormone associée aux processus physiologiques des plantes et aux réponses de défense à différents stress. Pour la voie de SA, la forte expression du gène PR4 a aussi été observé chez les plantes de concombre infectées par *R. solani* prétraité par *Trichoderma atroviride* TRS25 (Nawrocka et al., 2018). Ce gène code pour la chitinase, une enzyme qui participe à la protection directe contre les agents pathogènes. D'autres études ont également indiqué que le gène PR4 était surexprimé chez les plantes d'aubergine traitées par des agents de lutte biologique (Angelopoulou et al., 2014). PR4 est l'une des PR qui est spécialisée dans la dégradation des parois cellulaires fongiques et présente une synergie avec les b-1,3-glucanases. La PR10 agit comme un inhibiteur d'une ribonucléase, avec un rôle essentiel dans la défense contre les maladies des plantes. A l'inverse de nos résultats, Park et al. (2019) a trouvé que le gène PR10 a été fortement exprimé dans les feuilles de ginseng prétraitées avec *Trichoderma citrinoviride* par rapport aux autres traitements. Le gène PR5

code pour la thaumatine, qui joue un rôle dans la défense des plantes contre diverses conditions de stress et les attaques des agents pathogènes. Nos résultats ont montré que PR5 est fortement exprimé dans les feuilles des plantes prétraitées par BF25 et inoculées par Pm8, ces résultats ont été aussi rapportés par Park et al., (2019). Dans la littérature, il est décrit que la résistance systémique acquise (SAR) peut être déclenchée dans une plante après une infection locale causée par un pathogène et dépend de la voie de SA (Vlot et al. 2009). Alors que la résistance systémique induite (ISR) est déclenchée par des microorganismes bénéfiques (bactéries et champignons) et est régulée par des voies de signalisation dépendant de JA et ET (Pieterse et al., 2014). Il est clair dans cette étude que le consortium BF25 déclenche les 2 voies chez la lignée A17. Il a été montré que les micro-organismes bénéfiques peuvent déclencher les deux voies (SAR et ISR) et peuvent réguler un réseau complexe de signaux impliquant SA, JA et ET ainsi que des régulations croisées entre ces différentes voies, démontrant l'interconnexion de ces voies de réponse à l'attaque des agents phytopathogènes (Hermosa et al., 2012; Liu et al., 2015).



## Conclusion

L'agriculture durable nécessite le recrutement d'agents bactériens tels que les endophytes bactériens pour lutter contre diverses maladies des plantes. Les endophytes bactériens colonisent et habitent les tissus internes de la plante sans causer de dommages apparents. Au sein de la plante, ces bactéries exercent de multiples effets bénéfiques, dont la stimulation directe de la croissance des plantes par l'action de phytohormones ou la production de métabolites. Cependant, les endophytes bactériens protègent également leur plante hôte par le biais de la suppression des pathogènes ou en induisant le système immunitaire inné de la plante. Le présent travail a été focalisé sur l'étude de la diversité des communautés bactériennes endophytes de deux plantes modèle : *Solanum lycopersicum L.* et *Medicago truncatula*, ainsi que de leurs rôles potentiels en tant qu'agents protecteurs contre les maladies de ces plantes.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet protecteur des bactéries endophytes sur *S. lycopersicum L.* contre l'attaque par *B.cinerea* en condition de post-récolte. Cette étude a montré que les plants de tomates sains abritent diverses souches de bactéries endophytes colonisant principalement les feuilles et certaines d'entre elles émettant des COV avec une activité antifongique et/ou promotrice de croissance des plantes. Les souches de bactéries antagonistes identifiées ont montré un enrichissement significatif en espèces de *Bacillus* avec peu d'espèces d'*Enterobacter*. La caractérisation des COV libérés par plusieurs bactéries au pouvoir antifongique a montré un ensemble central de composés produits par toutes les bactéries sélectionnées, ainsi que certains composés volatils spécifiques à une souche, certains d'entre eux étant déjà signalés pour leurs activités antifongiques. Ce travail fournit des preuves de la capacité de contrôle biologique des souches d'*Enterobacter* et de *Bacillus*, médiée par les COV et les cellules végétatives, pour réduire l'infection post-récolte de *B. cinerea* sur les tomates. Il identifie également le 3-méthylbutan-1-ol comme composé antifongique volatil prometteur pour contrôler la moisissure grise pendant le stockage et le transport commercial.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet protecteur des bactéries endophytes de *M.truncatula* contre l'attaque par *P.medicaginis* et *V.alfalfae* en condition de pré-récolte. La reconstruction du microbiote (consortium de souches bactériennes) de chaque organe de chaque plante de chaque site a été faite montrant que les

plantes de luzerne annuelles abritent diverses souches de bactéries endophytes et au fort pouvoir inhibiteur *invitro* contre *P.medicaginis* et *V.alfalfae*. Le consortium le plus actif a montré une protection significative des plantes de la lignée A17 contre l'attaque par *V.alfalfae* et des lignées A17 et dans une moindre mesure F83005.5 contre *P.medicaginis*. L'étude d'expression des gènes de défense chez la lignée A17 contre *P.medicaginis* a montré l'implication des gènes de la voie SA et JA/ET dans l'activité de bioprotection du consortium contre l'attaque fongique suggérant une interconnection entre ces deux voies chez les plantes pour l'ISR contre les phytopathogènes.

## Perspectives

Cette étude a mis en évidence le rôle des bactéries endophytes dans l'amélioration de la croissance et de lutte biologique chez deux plantes d'intérêt économique à savoir *Solanum lycopersicum L.* et écologique à savoir *Medicago truncatula*. Le rôle des communautés endophytes bactériennes de ces deux espèces végétales pour contrôler les maladies des cultures en pré et en post-récolte a été démontré.

Cette étude incite ainsi à développer d'autres études plus approfondies pour l'étude de la biodiversité des bactéries endophytes, et leur interaction avec leurs hôtes sous stress biotique. Cette étude peut être faite en se basant sur des études plus poussées pour la caractérisation métagénomique des microbiotes endophytes des plantes. Une étude de la comparaison du microbiote des plantes saines et des plantes infectées peut être envisagée ainsi qu'une étude de comparaison entre les microbiotes des plantes spontanées et ceux des plantes domestiquées.

Dans cette étude on a montré que même à une échelle géographique réduite, une diversité bactérienne peut être décrite. Nos résultats suggèrent également que le type du sol (salin ou non) peut affecter la diversité microbienne endophyte. Une analyse approfondie de l'effet du type de sols et de son étage climatique sur la diversité microbienne endophyte doit être mise en place dans les prochaines études.

On a pu montrer aussi que les composés organiques volatils des bactéries endophytes sont des composés à effet inhibiteur des phytopathogènes et peuvent être utilisés en condition de post-récolte, de stockage et de protection pour la protection des fruits contre les attaques fongiques. Une étude de la méthode d'application de ces composés volatils bactériens peut être envisagée dans une étude postérieure.

Le niveau de complexité a augmenté, compte tenu des limites méthodiques et techniques actuelles de détection et d'identification des métabolites volatils, ainsi que de la dépendance de la biosynthèse bactérienne volatile et de la réponse des plantes aux conditions biotiques et abiotiques. On ne peut pas non plus ignorer que les interactions bactériennes volatiles-plantes jusqu'à présent ne font qu'effleurer la surface, car jusqu'à présent, des données principalement in vitro ont été accumulées. Le système de test est artificiel en ce qui concerne le nombre de partenaires en interaction. Les interactions multi-organismes dans la nature sont courantes. D'après les expériences menées antérieurement, il est également clair que les «volatilomes» sont modifiés dans des contextes multi-organismes contrairement aux

cultures à un seul microorganisme ce qui est probablement également le cas dans la nature. Les études postérieures doivent tenir en compte les volatils bactériens comme des facteurs agissant dans des systèmes multitrophiques soulignant les multiples fonctions et potentiels des volatiles dans les systèmes agricoles et les niches écologiques.

La capacité des bactéries endophytes à produire des composés antifongiques solubles et des enzymes hydrolytiques a été une nouvelle fois démontrée dans cette étude. Une caractérisation plus détaillée des composés solubles à savoir les lipopeptides et des enzymes hydrolytiques telles que la chitinase peut être envisagée en perspectives de cette étude. Ces métabolites peuvent servir comme matrice pour la formulation de biopesticides qui vont avoir pour conséquence la réduction d'application d'engrais chimiques et donc contribuer à une augmentation de la biodiversité dans les sites exploités en agriculture. Toutes les études postérieures doivent être basées sur une analyse et une sélection approfondie de différentes composantes de la bioformulation, une évaluation de la compatibilité entre les microorganismes, la détermination de la cause et des effets dans l'agroécosystème natif, le développement de recettes de formulation et de technologie de distribution adéquates, ainsi que la fourniture d'assistance technique aux agriculteurs afin de réussir l'application de la bioformulation.

Dans le cadre de ce travail, nous avons démontré que les bactéries endophytes issues de la tomate ou de la luzerne annuelle produisent une multitude de substances bioactives. Sur cette base et en se référant aux nouvelles méthodes analytiques récentes, on peut envisager une étude métabolique ayant pour but de décortiquer les interactions entre les plantes-endophytes-pathogène en se basant sur une analyse comparative des voies métaboliques de plantes prétraitées par les endophytes et sous condition de stress biotique. Ainsi, la métabolomique pourrait servir de puissant outil bioanalytique de routine pour la découverte du mode d'action des composés bioactifs et l'évaluation de leur toxicité pour les organismes non ciblés. De plus, l'étude approfondie de leur toxicité pour les organismes non ciblés peut servir d'outil de dépistage fiable pour l'identification précoce des molécules candidates qui devraient être exclues de la recherche.

On a démontré l'implication des gènes de voies de défenses JA/ET et SA dans la bioprotection des plantes de la lignée A17 de *M.truncatula* par le consortium bactérien BF25 contre l'attaque par *P.medicaginis*. Ces résultats doivent être confrontés aux résultats de l'étude de l'implication de ces mêmes voies dans la bioprotection des plantes des lignées

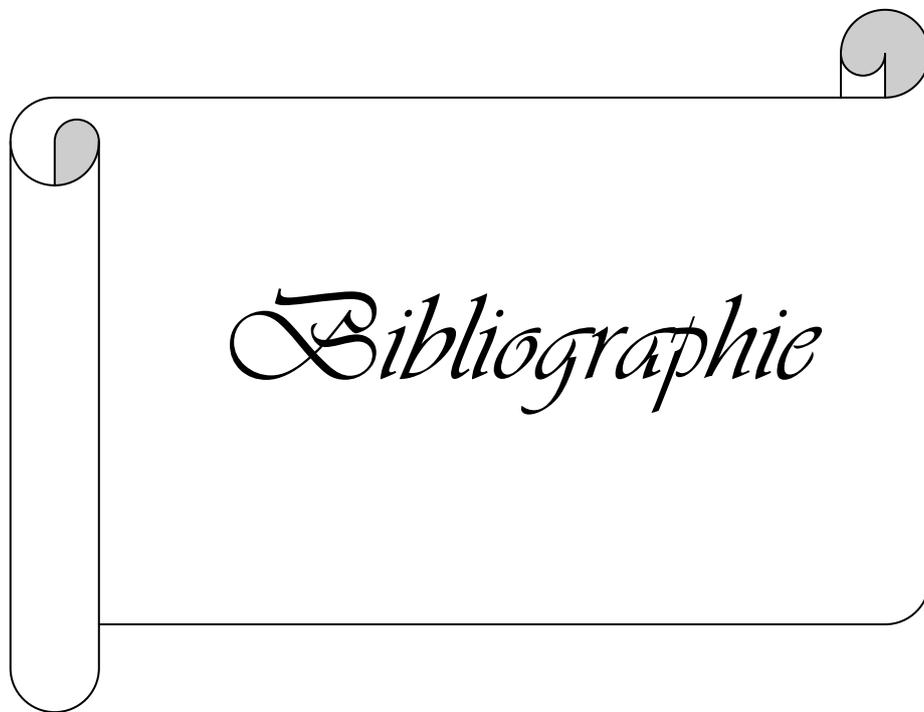
F83005.5 de *M.truncatula* par le consortium bactérien BF25 contre l'attaque par *P.medicaginis*.

Une étude des voies de défense chez les plantes de *M.truncatula* prétraitées par le consortium bactérien BF25 contre l'attaque par *V.alfalfae* doit être complétée pour estimer l'effet réel de la bioprotection des plantes de *M. truncatula* par le consortium bactérien sélectionné et faire le lien entre l'activité et la voie de défense impliquée.

Cette étude a confirmé une modulation des défenses végétales lors du biopriming par le consortium bactérien. Une étude génétique plus poussée doit être mise en place pour comprendre les mécanismes induits par le consortium bactérien endophytes chez la luzerne tronquée qui devraient conduire à une protection contre les deux phytopathogènes racinaires (*P.medicaginis* et *V.alfalfae*). Une attention particulière pourrait également être accordée aux phytohormones connues pour déclencher l'expression de divers gènes liés à la défense au cours de la résistance systémique induite.

Cette étude a mis en évidence le rôle des bactéries endophytes dans la promotion de croissance et dans la protection des plantes en condition pré et post-récolte. Les résultats de cette étude doivent être complétés par des études sous serre et dans le champ pour définir les conditions favorables pour atteindre avoir une meilleure protection des plantes par les endophytes. Les études postérieures doivent aussi tenir compte des variantes climatiques et écologie du sol.

Enfin, une approche interdisciplinaire associant des méthodes biotechnologiques traditionnelles et modernes (Métagénomique, transcriptomique, métabolomique) aidera à progresser vers une meilleure santé des plantes et une production alimentaire durable.





- Abid, G., Sassi, K., Muhovski, Y., Jacquemin, J.M., Mingeot, D., Tarchoun, N., Baudoin, J.P., 2012. Identification and Analysis of Differentially Expressed Genes During Seed Development Using Suppression Subtractive Hybridization (SSH) in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Biol. Report.* 30, 719–730. <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0381-7>
- Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S., 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Res.* 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Agisha, V. N., Kumar, A., Eapen, S. J., Sheoran, N., & Suseelabhai, R. (2019). Broad-spectrum antimicrobial activity of volatile organic compounds from endophytic *Pseudomonas putida* BP25 against diverse plant pathogens. *Biocontrol Science and Technology*, 29(11), 1069-1089.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology* (5th edition). Elsevier-Academic Press. San Diego, CA.
- Ahmad Mahmood, Oğuz Can Turgay, Muhammad Farooq, Rifat Hayat, Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 92, Issue 8, August 2016, fiw112, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>
- Ahuja, A., Ghosh, S.B., D'Souza, S.F., 2007. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. *Bioresour. Technol.* 98, 3408–3411. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.041>
- Ak, B., 2014. Bhattacharjee AK et al. pdf.
- Akhtar, N., Naveed, M., Khalid, M., Ahmad, N., Rizwan, M., & Siddique, S. (2018). Effect of bacterial consortia on growth and yield of maize grown in *Fusarium* infested soil. *Soil & Environment*, 37(1).
- Aleklett, K., Leff, J.W., Fierer, N., Hart, M., 2015. Wild plant species growing closely connected in a subalpine meadow host distinct root-associated bacterial communities. *PeerJ* 2015, 1–19. <https://doi.org/10.7717/peerj.804>

- Ali, S., Charles, T.C., Glick, B.R., 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.003>
- Angelopoulou, D.J., Naska, E.J., Paplomatas, E.J., Tjamos, S.E., 2014. Biological control agents (BCAs) of verticillium wilt: Influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. *Plant Pathol.* 63, 1062–1069. <https://doi.org/10.1111/ppa.12198>
- Arellano-Aguilar, O., & Rendón, O. J. (2016). La huella de los plaguicidas en México. *E. Martínez. Greenpeace México AC Las Flores*, 35.
- Arkipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E. V., Kudoyarova, G.R., 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272, 201–209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L., 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biol. Control* 53, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.010>
- Asari, S., Matzén, S., Petersen, M.A., Bejai, S., Meijer, J., 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: Plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070>
- Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M., Khaliq, A., 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol. Fertil. Soils* 35, 231–237. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0462-8>
- Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.M., Ghigo, J.M., 2015. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 222–233. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu013>
- Backhouse, D., & Willetts, H. J. (1987). Development and structure of infection cushions of *Botrytis cinerea*. *Transactions of the British Mycological Society*, 89(1), 89-95.
- Bailly, A., Weiskopf, L., 2012. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth

- current knowledge and future challenges. *Plant Signal. Behav.* 7. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18418>
- Bakker, A.W., Schippers, B., 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19, 451–457. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90037-X)
- Balthazar, C., Cantin, G., Novinscak, A., Joly, D.L., Filion, M., 2020. Expression of Putative Defense Responses in Cannabis Primed by *Pseudomonas* and/or *Bacillus* Strains and Infected by *Botrytis cinerea*. *Front. Plant Sci.* 11, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572112>
- Bass, D., Stentiford, G.D., Wang, H.C., Koskella, B., Tyler, C.R., 2019. The Pathobiome in Animal and Plant Diseases. *Trends Ecol. Evol.* 34, 996–1008. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.012>
- Beever, R. E., & Weeds, P. L. (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In ‘*Botrytis: biology, pathology and control*’. (Eds Y Elad, B Williamson, P Tudzynski, N Delen) pp. 29–52.
- Ben Slimene, I., Tabbene, O., Djebali, N., Cosette, P., Schmitter, J.M., Jouenne, T., Urdaci, M.C., Limam, F., 2012. Putative use of a *Bacillus subtilis* L194 strain for biocontrol of *Phoma medicaginis* in *Medicago truncatula* seedlings. *Res. Microbiol.* 163, 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.03.004>
- Ben, C., Toueni, M., Montanari, S., Tardin, M. C., Fervel, M., Negahi, A., ... & Prospéri, J. M. (2013). Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to *Verticillium* wilt. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 317-332.
- Benizri, E., Baudoin, E., Guckert, A., 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Technol.* 11, 557–574. <https://doi.org/10.1080/09583150120076120>
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., de Jonge, R., Burgman, W. P., ... & Pieterse, C. M. (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME journal*, 12(6), 1496-1507.

- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., Köberl, M., Price, A., 2017. Europe PMC Funders Group  
The plant microbiome explored: implications for experimental botany 67, 995–1002.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv466>.The
- Bernardo-Cravo, A.P., Schmeller, D.S., Chatzinotas, A., Vredenburg, V.T., Loyau, A., 2020.  
Environmental Factors and Host Microbiomes Shape Host–Pathogen Dynamics. Trends  
Parasitol. 36, 616–633. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.010>
- Bodenhausen, N., Horton, M.W., Bergelson, J., 2013. Bacterial Communities Associated with  
the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>
- Böhm, M., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., 2007. Twitching motility is essential for  
endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub>-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Mol.  
Plant-Microbe Interact. 20, 526–533. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0526>
- Bolívar-Anillo, H.J., Garrido, C., Collado, I.G., 2019. Endophytic microorganisms for  
biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Phytochem. Rev. 1–42.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>
- Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix, H., Dhondt, S., Ait Barka, E., Kauffmann, S., Jeandet, P.,  
Mazeyrat-Gourbeyre, F., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., 2011. Comparative  
analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting  
rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium  
*Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. J. Exp. Bot. 62, 595–603.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq291>
- Bouaoud, Y., Troulet, C., Foughalia, A., Berge, O., Aissat, K., Bardin, M., 2018. A multi-criteria  
approach for the selection of efficient biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on tomato in  
Algeria. BioControl 63, 299–311. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9851-7>
- Boukaew, S., Prasertsan, P., Troulet, C., Bardin, M., 2017. Biological control of tomato gray mold  
caused by *Botrytis cinerea* by using *Streptomyces* spp. BioControl 62, 793–803.  
<https://doi.org/10.1007/s10526-017-9825-9>
- Bright, M.; Bulgheresi, S. A complex journey: Transmission of microbial symbionts. Nat.  
Rev. Microbiol. 2010,8, 218–230
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P.C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., McHardy,  
A.C., Schulze-Lefert, P., 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in

- wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe* 17, 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P., 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A.P., Blanco, D., Venturini, M.E., 2020. Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biol. Technol.* 166, 111208. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111208>
- Cappuccino, J.G., Sherman, N., 2005. . *Microbiology: A Laboratory Manual*, p. 507. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco.
- Carrell, A.A., Frank, A.C., 2014. *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Front. Microbiol.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00333>
- Carroll, G. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988, 69, 2–9.
- Cavicchioli, R., Ripple, W.J., Timmis, K.N., Azam, F., Bakken, L.R., Baylis, M., Behrenfeld, M.J., Boetius, A., Boyd, P.W., Classen, A.T., Crowther, T.W., Danovaro, R., Foreman, C.M., Huisman, J., Hutchins, D.A., Jansson, J.K., Karl, D.M., Koskella, B., Mark Welch, D.B., Martiny, J.B.H., Moran, M.A., Orphan, V.J., Reay, D.S., Remais, J. V., Rich, V.I., Singh, B.K., Stein, L.Y., Stewart, F.J., Sullivan, M.B., van Oppen, M.J.H., Weaver, S.C., Webb, E.A., Webster, N.S., 2019. Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 569–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>
- Chaibub, A.A., de Sousa, T.P., de Araújo, L.G., de Filippi, M.C.C., 2020. *Cladosporium cladosporioides* C24G Modulates Gene Expression and Enzymatic Activity During Leaf Blast Suppression in Rice Plants. *J. Plant Growth Regul.* 39, 1140–1152. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10052-9>

- Chanprapai, P., Chavasiri, W., Kubo, I., 2018. Anti-rice pathogenic microbial activity of *Persicaria* sp. Extracts. *Sci. Technol. Asia* 23 (4), 32–41. <https://doi.org/10.14456/scitechasia.2018.30>.
- Chaparro, J.M., Badri, D. V., Vivanco, J.M., 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* 8, 790–803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>
- Chen, Q., Jiang, J.R., Zhang, G.Z., Cai, L., Crous, P.W., 2015. Resolving the *Phoma* enigma. *Stud. Mycol.* 82, 137–217. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., Guo, J.H., 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 15, 848–864. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x>
- Chen, Y.Y., Chen, P.C., Tsay, T.T., 2016. The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. *Biol. Control* 98, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
- Cheng, Z.J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y.H., Li, W., Sun, T.T., Zhao, X.Y., Li, X.G., Cheng, Y., Zhao, Y., Xie, Q., Zhang, X.S., 2013. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by *AUXIN RESPONSE FACTOR3*. *Plant Physiol.* 161, 240–251. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203166>
- Chernin, L., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Khmel, I., 2013. Quorum-Sensing Quenching by Volatile Organic Compounds Emitted by Rhizosphere Bacteria. *Mol. Microb. Ecol. Rhizosph.* 2, 791–800. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch75>
- Chihaoui, S.A., Djébal, N., Mrabet, M., Barhouni, F., Mhamdi, R., Mhadhbi, H., 2014. *Phoma medicaginis* colonizes *Medicago truncatula* root nodules and affects nitrogen fixation capacity. *Eur. J. Plant Pathol.* 141, 375–383. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0549-8>
- Chihaoui, S.A., Trabelsi, D., Jdey, A., Mhadhbi, H., Mhamdi, R., 2015. Inoculation of *Phaseolus vulgaris* with the nodule-endophyte *Agrobacterium* sp. 10C2 affects richness and structure of rhizosphere bacterial communities and enhances nodulation and growth. *Arch. Microbiol.* 197,

805–813. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1118-z>

- Choudhary, D.K., Varma, A., Tuteja, N., 2017. Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture. *Plant-Microbe Interact. An Approach to Sustain. Agric.* 1–509. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0>
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X.W., Borriss, R., 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front. Microbiol.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., Knight, R., 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* 148, 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Coertze, S., & Holz, G. (2002). Epidemiology of *Botrytis cinerea* on grape: wound infection by dry, airborne conidia. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23(2), 72–91.
- Cohen, A.C., Travaglia, C.N., Bottini, R., Piccoli, P.N., 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany* 87, 455–462. <https://doi.org/10.1139/B09-023>
- Cole, L.K., Blum, M.S., 1975. Antifungal properties of the insect alarm pheromones, citral, 2-heptanone, and 4-methyl-3-heptanone. *Mycologia* 67, 701–708. <https://doi.org/10.2307/3758330>
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42, 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Christophe, C., Barka, Ait, E., 2005. PAS 100:2011 Specification for Composted Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1–68. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951>
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H., Sessitsch, A., 2011. Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *Microb. Ecol.* 62, 188–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>

- Compant, S.; Reiter, B.; Sessitsch, A.; Nowak, J.; Clément, C.; Ait Barka, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1685–1693.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Langenbach, C.J.G., Jaskiewicz, M.R., 2015. Priming for Enhanced Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* *53*, 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Contreras-Pérez, M., Hernández-Salmerón, J., Rojas-Solís, D., Rocha-Granados, C., Orozco-Mosqueda, M. del C., Parra-Cota, F.I., de los Santos-Villalobos, S., Santoyo, G., 2019. Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. *Biloxi*) growth-promoting bacterium. *3 Biotech* *9*. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1911-5>
- Correa, O.S., Romero, A.M., Montecchia, M.S., Soria, M.A., 2007. Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 781–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03122.x>
- Dalal, J.M., Kulkarni, N.S., 2015. Utilization of Indigenous Endophytic Microbes for Induction of Systemic Resistance (ISR) in Soybean (*Glycine Max* (L) Merrill) Against Challenge Inoculation. *Res. Biotechnol.* *6*, 10–25.
- Damasceno, C.L., Duarte, E.A.A., dos Santos, L.B.P.R., de Oliveira, T.A.S., de Jesus, F.N., de Oliveira, L.M., Góes-Neto, A., Soares, A.C.F., 2019. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. *Biol. Control* *137*, 104016. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104016>
- Dastogeer, K.M.G., Tumpa, F.H., Sultana, A., Akter, M.A., Chakraborty, A., 2020. Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Curr. Plant Biol.* *23*, 100161. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100161>
- De León, I.P., Oliver, J.P., Castro, A., Gaggero, C., Bentancor, M., Vidal, S., 2007. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* *7*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-52>

- De Rybel, B., Mähönen, A. P., Helariutta, Y., & Weijers, D. (2016). Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1), 30.
- De Vrieze, M., Germanier, F., Vuille, N., & Weisskopf, L. (2018). Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2573.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Deb, D., Khan, A., Dey, N., 2020. Phoma diseases: Epidemiology and control. *Plant Pathol.* 69, 1203–1217. <https://doi.org/10.1111/ppa.13221>
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S.C., Hofte, M., 2017. Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Front. Microbiol.* 8, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01186>
- Dheeman, S., Maheshwari, D.K., Baliyan, N., 2017. Bacterial Endophytes for Ecological Intensification of Agriculture. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-66541-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66541-2_9)
- DHINGRA, O. S. (1995). JB 1985. Basic Plant Pathology Methods.
- Dhouib, H., Zouari, I., Ben Abdallah, D., Belbahri, L., Taktak, W., Triki, M.A., Tounsi, S., 2019. Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. *Biol. Control* 139, 104092. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104092>
- Dhulipala, M.R., 2007. No Title.
- Di Francesco, A., Di Foggia, M., Baraldi, E., 2020. *Aureobasidium pullulans* volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *Food Microbiol.* 87, 103395. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103395>
- Di Francesco, A., Martini, C., Mari, M., 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *Eur. J. Plant Pathol.* 145, 711–717. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0867-0>
- Dias, A.C.F., Costa, F.E.C., Andreote, F.D., Lacava, P.T., Teixeira, M.A., Assumpção, L.C.,

- Araújo, W.L., Azevedo, J.L., Melo, I.S., 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 189–195. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9878-0>
- Djebali, N. (2013). Aggressiveness and host range of *Phoma medicaginis* isolated from *Medicago* species growing in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 3-15.
- Dodd, I.C., Zinovkina, N.Y., Safronova, V.I., Belimov, A.A., 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann. Appl. Biol.* 157, 361–379. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00439.x>
- Dong Zhongmin, Canny, M.J., McCully, M.E., Roboredo, M.R., Fernandez Cabadilla, C., Ortega, E., Rodes, R., 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* 105, 1139–1147. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1139>
- Droby, S., & Lichter, A. (2004). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management, 349-367. *Kluwer Academic Publ., London, UK*.
- Dudeja, S.S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., Kothe, E., 2012. Interaction of endophytic microbes with legumes. *J. Basic Microbiol.* 52, 248–260. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100063>
- Dugué, P., Vayssières, J., Chia, E., Ouédraogo, S., Havard, M., Coulibaly, D., Nacro, H.B., Sissoko, F., Sangare, M., Vall, E., 2012. L'intensification écologique : réflexions pour la mise en pratique de ce concept dans les zones de savane d'Afrique de l'Ouest. Séminaire Partenariat, modélisation, expérimentations quelles leçons pour la Concept. l'innovation l'intensification écologique ? 15 p.
- Durham, D.R., Stewart, D.B., Stellwag, E.J., 1987. Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J. Bacteriol.* 169, 2762–2768. <https://doi.org/10.1128/jb.169.6.2762-2768.1987>
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Edwards, J.; Johnson, C.; Santos-Medellín, C.; Lurie, E.; Podishetty, N.K.; Bhatnagar, S.; Eisen, J.A.; Sundaresan, V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, E911–E920.

- Elkahoui, S., Djébal, N., Yaich, N., Azaiez, S., Hammami, M., Essid, R., Limam, F., 2015. Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas* P2 strain against *Rhizoctonia solani*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 175–185. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1772-3>
- Ellwood, S.R., Kamphuis, L.G., Oliver, R.P., 2006. Identification of Sources of Resistance to *Phoma medicaginis* Isolates in *Medicago truncatula* SARDI Core Collection Accessions , and Multigene Differentiation of Isolates 1330–1336.
- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1505–1520. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.12.017>
- Engelbrecht, R. (2002). *The role of the mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata, in Botrytis bunch rot of grape* (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).
- Enya, J., Koitabashi, M., Shinohara, H., Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Negishi, H., Suyama, K., Tsushima, S., 2007. Phylogenetic diversities of dominant culturable *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Pantoea* species on tomato leaves and their possibility as biological control agents. *J. Phytopathol.* 155, 446–453. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01256.x>
- Enya, Junichiro, Shinohara, H., Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Negishi, H., Suyama, K., Tsushima, S., 2007. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microb. Ecol.* 53, 524–536. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9085-1>
- Epton, H. A. S., & Richmond, D. V. (1980). Formation, structure and germination of conidia. *Biology of Botrytis*, edited by JR Coley-Smith, K. Verhoeff, WR Jarvis.
- Erdogan, O., Benlioglu, K., 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biol. Control* 53, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.011>
- Essghaier, B., Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Hajlaoui, M.R., Boudabous, A., Jijakli, H., Sadfi-Zouaoui, N., 2009. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 106, 833–846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04053.x>

- Faretra, F., Antonacci, E., Pollastro, S., 1988. Sexual Behaviour and Mating System of *Botryotinia fuckeliana*, Teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* 134, 2543–2550. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-9-2543>
- Faure, D., Simon, J.C., Heulin, T., 2018. Holobiont: a conceptual framework to explore the eco-evolutionary and functional implications of host–microbiota interactions in all ecosystems. *New Phytol.* 218, 1321–1324. <https://doi.org/10.1111/nph.15199>
- Ferchichi, N., Toukabri, W., Boularess, M., Smaoui, A., Mhamdi, R., Trabelsi, D., 2019. Isolation, identification and plant growth promotion ability of endophytic bacteria associated with lupine root nodule grown in Tunisian soil. *Arch. Microbiol.* 201, 1333–1349. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01702-3>
- Ferreira, A.; Quecine, M.C.; Lacava, P.T.; Oda, S.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, 287, 8–14.
- Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Fillinger, S., Elad, Y., 2015. *Botrytis* - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. *Botrytis - Fungus, Pathog. its Manag. Agric. Syst.* 1–486. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G., 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1145–1152. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1077-7>
- Francl, L.J., 2001. The Disease Triangle: A Plant Pathological Paradigm Revisited. *Plant Heal. Instr.* 1–5. <https://doi.org/10.1094/phi-t-2001-0517-01>
- Franco, C., Michelsen, P., Percy, N., Conn, V., Listiana, E., Moll, S., Loria, R., Coombs, J., 2007. Actinobacterial endophytes for improved crop performance. *Australas. Plant Pathol.* 36, 524–531. <https://doi.org/10.1071/AP07067>
- Gagne-Bourgue, F.; Aliferis, K.A.; Seguin, P.; Rani, M.; Samson, R.; Jabaji, S. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, 114, 836–853.

- Gajanana, T.M., Krishna Moorthy, P.N., Anupama, H.L., Raghunatha, R., Prasanna Kumar, G.T., 2006. Integrated Pest and Disease Management in Tomato: An Economic Analysis. *Agric. Econ. Res. Rev.* 19, 269–280.
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M.G., Berta, G., 2004. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0256-3>
- Ganz T (2013) Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 93:1721–1741
- Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., Guan, W., 2018. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00456>
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., Zhang, Y., 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 105, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., Zhang, Y., 2017a. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 105, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., Zhang, Y., 2017b. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 105, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28, 1091–1101. <https://doi.org/10.1002/bies.20493>
- Geigenberger, P., Vigeolas, H., Hu, D., 2011. Nonsymbiotic Hemoglobin-2 Leads to an Elevated Energy State and to a Combined Increase in Polyunsaturated Fatty Acids and Total Oil Content When Overexpressed in Developing Seeds of Transgenic Arabidopsis Plants 1 [ OA ] 155, 1435–1444. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166462>

- Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica (Cairo). 2012.
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiol. Res. 169, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Glick, B.R., 2015. Beneficial plant-bacterial interactions. Benef. Plant-Bacterial Interact. 1–243. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0>
- Gong, A.D., Dong, F.Y., Hu, M.J., Kong, X.W., Wei, F.F., Gong, S.J., Zhang, Y.M., Zhang, J.B., Wu, A.B., Liao, Y.C., 2019. Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. Food Control 106. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106718>
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food Agric. 2. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. Food Microbiol. 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017a. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. Food Microbiol. 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017b. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. Food Microbiol. 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- Gray, K.M., Garey, J.R., 2001. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. Microbiology 147, 2379–2387. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2379>
- Gruyter, D., 2008. Reviews , Critiquesand New Technologies Biology and recent developments in the systematics of *Phoma* , a complex genus of major quarantine significance 1–18.

- Gupta, A., Pal, R.K., Rajam, M.V., 2013. Delayed ripening and improved fruit processing quality in tomato by RNAi-mediated silencing of three homologs of 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene. *J. Plant Physiol.* 170, 987–995. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.02.003>
- Gupta, G., Panwar, J., Jha, P.N., 2013. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. *Appl. Soil Ecol.* 64, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.016>
- Gupta, P., Samant, K., Sahu, A., 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int. J. Microbiol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P.C., Garrido-Oter, R., Thon, M.R., Weimann, A., Damm, U., Dallery, J.F., Hainaut, M., Henrissat, B., Lespinet, O., Sacristán, S., Ver Loren Van Themaat, E., Kemen, E., McHardy, A.C., Schulze-Lefert, P., O'Connell, R.J., 2016. Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat. Commun.* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11362>
- Haidar, R., Roudet, J., Bonnard, O., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Fert, M., Gautier, T., Deschamps, A., Fermaud, M., 2016. Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeoemoniella chlamydsopora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiol. Res.* 192, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.003>
- Hallmann, J., & Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 15-31). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hankin, L., Zucker, M., Sands, D.C., 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22, 205–209. <https://doi.org/10.1128/aem.22.2.205-209.1971>
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A., 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 293–320. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00050-14>

- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Elsas, J.D. van, 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Harrison, J. G., Lowe, R., & Williams, N. A. (1994). Humidity and fungal diseases of plants—problems. *Ecology of plant pathogens (Edited by: JP Blakeman, B Williamson) Wallingford: CAB International, 79-97.*
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., Berg, G., 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321, 235–257. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9814-y>
- Hawksworth, D. L., & Talboys, P. W. (1970). *Verticillium albo-atrum. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria.*
- Hedden, P., Thomas, S.G., 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444, 11–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20120245>
- Heimpel, G. E., & Mills, N. J. (2017). *Biological control.* Cambridge University Press.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E., 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* 81, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* 81, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Herre, E.A.; Knowlton, N.; Mueller, U.G.; Rehner, S.A. The evolution of mutualisms: Exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* 1999, 14, 49–53

- Hodgson, S.; de Cates, C.; Hodgson, J.; Morley, N.J.; Sutton, B.C.; Gange, A.C. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecol. Evol.* 2014, 4, 1199–1208
- Hori, K., Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* 48, 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014>
- Horton, M.W., Bodenhausen, N., Beilsmith, K., Meng, D., Muegge, B.D., Subramanian, S., Vetter, M.M., Vilhjálmsson, B.J., Nordborg, M., Gordon, J.I., Bergelson, J., 2014. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community. *Nat. Commun.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms6320>
- Hsiang, T., & Chastagner, G. A. (1992). Production and viability of sclerotia from fungicide-resistant and fungicide-sensitive isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica* and *B. tulipae*. *Plant Pathology*, 41(5), 600-605.
- Hsu, S.C., Lockwood, J.L., 1975. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Appl. Microbiol.* 29, 422–426. <https://doi.org/10.1128/aem.29.3.422-426.1975>
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., Shiping, T., 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Qual. Saf.* 2, 111–119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* 106, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.010>
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, R.M., Usami, T., Platt, H.W., Subbarao, K. V., 2011. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>
- Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., Subbarao, K. V., 2013. Identification and Differentiation of *Verticillium* Species and *V. longisporum* Lineages by Simplex and Multiplex PCR Assays. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065990>
- Inderbitzin, P., Subbarao, K. V., 2014. *Verticillium* systematics and evolution: How confusion impedes *verticillium* wilt management and how to resolve it. *Phytopathology* 104, 564–

574. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-13-0315-IA>

- Ivleva, N. B., Groat, J., Staub, J. M., & Stephens, M. (2016). Expression of active subunit of nitrogenase via integration into plant organelle genome. *PLoS One*, *11*(8), e0160951
- Jaaffar, A.K.M., Parejko, J.A., Paulitz, T.C., Weller, D.M., Thomashow, L.S., 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia* isolates to phenazine-1-carboxylic acid and biological control by phenazine-producing *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* *107*, 692–703. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-16-0257-R>
- Jarvis, W. R. (1962). The infection of strawberry and raspberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr. *Annals of applied Biology*, *50*(3), 569-575.
- Jarvis, W. R. (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity-A guide to the literature.
- Jarvis, W. R. (1980). Taxonomy. *The biology of Botrytis*, 1-18.
- Jha, C.K., Aeron, A., Patel, B. V, Dinesh, K., 2011. Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. *Bact. Agrobiol. Plant Growth Responses*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9>
- Jiang, C.H., Liao, M.J., Wang, H.K., Zheng, M.Z., Xu, J.J., Guo, J.H., 2018. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* *126*, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.017>
- Jin, W., Wu, F., 2015. Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves. *BMC Plant Biol.* *15*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0410-4>
- Johnston-Monje, D.; Raizada, M.N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* *2011*, *6*, e20396.
- Joseph, B., Mini Priya, R., 2011. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A review. *Am. J. Biochem. Mol. Biol.* *1*, 291–309. <https://doi.org/10.3923/ajbmb.2011.291.309>
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla, B., 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* *187*, 351–

360. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0199-0>

- Kalai-Grami, L., Saidi, S., Bachkouel, S., Slimene, I. Ben, Mnari-Hattab, M., Hajlaoui, M.R., Limam, F., 2014. Isolation and Characterization of Putative Endophytic Bacteria Antagonistic to *Phoma tracheiphila* and *Verticillium albo-atrum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 365–375.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1062-4>
- Kamphuis, L.G., Lichtenzveig, J., Oliver, R.P., Ellwood, S.R., 2008. Two alternative recessive quantitative trait loci influence resistance to spring black stem and leaf spot in *Medicago truncatula* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-30>
- Kefi, A., Ben Slimene, I., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaeiz, S., Bejaoui, M., Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T., Limam, F., 2015. Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1967–76.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-015-1943-x>
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., Apajalahti, J., 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2079–2085.  
<https://doi.org/10.1128/aem.64.6.2079-2085.1998>
- Khan, A.L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Lee, I.J., 2015. Endophytic fungi: Resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Crit. Rev. Biotechnol.* 35, 62–74. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.800018>
- Khan, A.W., Tremblay, D., LeDuy, A., 1986. Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 373–377.  
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90139-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90139-0)
- Khan, Z.; Guelich, G.; Phan, H.; Redman, R.; Doty, S. Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses. *ISRN Agron.* 2012, 2012, 890280.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., 2007. Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance, Microbial Root Endophytes. [https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_3](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_3)
- Kost, T., Stopnisek, N., Agnoli, K., Eberl, L., Weiskopf, L., 2013. Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated Burkholderia species, is involved in successful root

- colonization of lupin and maize by *Burkholderia phytofirmans*. *Front. Microbiol.* 4, 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00421>
- Kumar, A., Droby, S., Singh, V.K., Singh, S.K., White, J.F., 2020. Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants, *Microbial Endophytes*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819654-0.00001-6>
- Kumar, M., 2015. Plant-Growth- Promoting Rhizobacteria ( PGPR ) and Medicinal Plants.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2703.8241>
- Ladygina, N., Hedlund, K., 2010. Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 42, 162–168.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.009>
- Latha, P., Karthikeyan, M., Rajeswari, E., 2019. Endophytic bacteria: prospects and applications for the plant disease management. In: Ansari, R., Mahmood, I. (Eds.), *Plant Health Under Biotic Stress*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_1).
- Lawal, O., Knobel, H., Weda, H., Nijsen, T.M.E., Goodacre, R., Fowler, S.J., Ahmed, W.M., Artigas, A., Bannard-Smith, J., Bos, L.D.J., Camprubi, M., Coelho, L., Dark, P., Davie, A., Diaz, E., Goma, G., Felton, T., Fowler, S.J., Leopold, J.H., van Oort, P.M.P., Pova, P., Portsmouth, C., Rattray, N.J.W., Rijnders, G., Schultz, M.J., Steenwelle, R., Sterk, P.J., Valles, J., Verhoeckx, F., Vink, A., White, I.R., Winters, T., Zakharkina, T., 2018. TD/GC–MS analysis of volatile markers emitted from mono- and co-cultures of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* in artificial sputum. *Metabolomics* 14, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1357-5>
- Lee, S.C., Luan, S., 2012. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell Environ.* 35, 53–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x>
- Lee, T., Park, D., Kim, K., Lim, S.M., Yu, N.H., Kim, S., Kim, H.Y., Jung, K.S., Jang, J.Y., Park, J.C., Ham, H., Lee, S., Hong, S.K., Kim, J.C., 2017. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* species. *Plant Pathol. J.* 33, 499–507.  
<https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.06.2017.0126>

- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., Chuenchitt, S., 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.024>
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., Hsiang, T., 2012. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biol. Control* 61, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.014>
- Li, Y., Duan, T., Nan, Z., Li, Y., 2019. Arbuscular mycorrhizal fungus alleviates alfalfa leaf spots caused by *Phoma medicaginis* revealed by RNA-seq analysis. *J. Appl. Microbiol.* 1–14. <https://doi.org/10.1111/jam.14387>
- Li, Yonggang, Wang, R., Liu, J., Xu, L., Ji, P., Sun, L., Pan, H., Jiang, B., Li, L., 2019. Identification of a biocontrol agent *Bacillus vallismortis* BV23 and assessment of effects of its metabolites on *Fusarium graminearum* causing corn stalk rot. *Biocontrol Sci. Technol.* 29, 263–275. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548575>
- Lim, S.M., Yoon, M.Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Shin, T.S., Park, H.W., Yu, N.H., Kim, Y.H., Kim, J.C., 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic bacillus velezensis G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 33, 488–498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Lindemann, S.R., Bernstein, H.C., Song, H.S., Fredrickson, J.K., Fields, M.W., Shou, W., Johnson, D.R., Beliaev, A.S., 2016. Engineering microbial consortia for controllable outputs. *ISME J.* 10, 2077–2084. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.26>
- Liu, C., Yin, X., Wang, Q., Peng, Y., Ma, Y., Liu, P., Shi, J., 2018. Antagonistic activities of volatiles produced by two *Bacillus* strains against *Monilinia fructicola* in peach fruit. *J. Sci. Food Agric.* 98, 5756–5763. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9125>
- Liu, H., Brettell, L.E., Qiu, Z., Singh, B.K., 2020. Microbiome-Mediated Stress Resistance in Plants. *Trends Plant Sci.* 25, 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.014>
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M.J., Schenk, P.M., 2017. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M.J., Schenk, P.M., 2017. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic

- bacteria. *Front. Microbiol.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>
- Liu, W., Mu, W., Zhu, B., Liu, F., 2008. Antifungal Activities and Components of VOCs Produced by *Bacillus subtilis* G8. *Curr. Res. Bacteriol.* <https://doi.org/10.3923/crb.2008.28.34>
- Liu, Y.; Zuo, S.; Xu, L.; Zou, Y.; Song, W. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Arch. Microbiol.* 2012, 194, 1001–1012. Hardoim, P.R.; Hardoim, C.C.; Van Overbeek, L.S.; Van Elsas, J.D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS ONE* 2012, 7, e30438.
- Liu, Z., Zhang, S., Sun, N., Liu, H., Zhao, Y., Liang, Y., Zhang, L., Han, Y., 2015. Functional diversity of jasmonates in rice. *Rice* 8. <https://doi.org/10.1186/s12284-015-0042-9>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López, S.M.Y., Pastorino, G.N., Fernández-González, A.J., Franco, M.E.E., Fernández-López, M., Balatti, P.A., 2020. The endosphere bacteriome of diseased and healthy tomato plants. *Arch. Microbiol.* 202, 2629–2642. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01987-9>
- Lugtenberg, B., 2015. Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture. *Princ. Plant-Microbe Interact. Microbes Sustain. Agric.* 1–448. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3>
- Lyu, A., Yang, L., Wu, M., Zhang, J., Li, G., 2020. High Efficacy of the Volatile Organic Compounds of *Streptomyces yanglinensis* 3-10 in Suppression of *Aspergillus* Contamination on Peanut Kernels. *Front. Microbiol.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00142>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., Freitas, H., 2016. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Environ. Manage.* 174, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Ma, Y.; Rajkumar, M.; Luo, Y.; Freitas, H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—Effects on plant growth and Ni uptake. *J. Hazard. Mater.* 2011, 195, 230–237.
- Macedo-Raygoza, G.M., Valdez-Salas, B., Prado, F.M., Prieto, K.R., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Canto-Canché, B.B., Carrillo-Beltrán, M., Di Mascio, P., White, J.F., Beltrán-García, M.J., 2019. *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-

- transfer symbiosis with banana plants and protects against the black sigatoka pathogen. *Front. Microbiol.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00804>
- Mahartha, K.A., Suprpta, D.N., 2018. Efficacy of *Enterobacter cloacae* KtB3 to control damping-off disease on soybean caused by *Sclerotium rolfsii*. *Int. J. Agric. Biol.* 20, 871–876. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0578>
- Maheshwari, R., Bhutani, N., Bhardwaj, A., Suneja, P., 2019. Functional diversity of cultivable endophytes from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum*: Bioprospecting their plant growth potential. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 20, 101229. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101229>
- Mahuku, G.S., 2004. A Simple Extraction Method Suitable for PCR- Based Analysis of Plant , Fungal , and Bacterial DNA 71–81.
- Mannaa, M., Seo, Y.S., 2021. Plants under the attack of allies: Moving towards the plant pathobiome paradigm. *Plants* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10010125>
- Mari, M., Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., 2016. Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.014>
- Marques, A.P.G.C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L., 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1229–1235. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.014>
- Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J., Ramos, J.L., Ramos-González, M.I., 2007. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r179>
- Matson, P. A., & Vitousek, P. M. (2006). Agricultural intensification: will land spared from farming be land spared for nature?. *Conservation Biology*, 20(3), 709-710.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* (80-.). 277, 504–509. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.504>
- Melkina, O.E., Khmel, I.A., Plyuta, V.A., Koksharova, O.A., Zavilgelsky, G.B., 2017.

- Ketones 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-undecanone inhibit DnaK-dependent refolding of heat-inactivated bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells lacking small chaperon IbpB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5765–5771. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8350-1>
- Mercado-Blanco, J., Lugtenberg, B., 2014. Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Curr. Biotechnol.* 3, 60–75. <https://doi.org/10.2174/22115501113026660038>
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R.M., 2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol. Control* 30, 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.02.002>
- Metoui Ben Mahmoud, O., Hidri, R., Talbi-Zribi, O., Taamalli, W., Abdelly, C., Djébalí, N., 2020. Auxin and proline producing rhizobacteria mitigate salt-induced growth inhibition of barley plants by enhancing water and nutrient status. *South African J. Bot.* 128, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.023>
- MEYER, J.-Y., 1962. La Lutte Biologique Contre Les Espèces Introduites Envahissantes : Solution Miracle Ou Methode Risquée ?
- Michael Hansen, Lene Kragelund, Ole Nybroe, Jan Sørensen, Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 23, Issue 4, August 1997, Pages 353–360, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00416.x>
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., Stanys, V., 2015. Bakterinių endofitų reikšmė žemės ūkio augalų atsparumui stresui: Apžvalga. *Zemdirbyste* 102, 465–478. <https://doi.org/10.13080/z-a.2015.102.060>
- Mnasri, N., Chennaoui, C., Gargouri, S., Mhamdi, R., Hessini, K., Elkahoui, S., Djébalí, N., 2017. Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria in vitro and as seed coating for the control of *Fusarium culmorum* infecting durum wheat in Tunisia. *Eur. J. Plant Pathol.* 147, 501–515. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1018-3>
- Molinéro-Demilly, V., Montegano, B., Julier, B., Giroult, C., Baudouin, P., Chosson, J.F., Bayle, B., Noël, D., Guénard, M., Gensollen, V., 2007. Resistance to *Verticillium albo-*

- atrum in lucerne (*Medicago sativa* L.) to distinguish between varieties. *Euphytica* 153, 227–232. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9258-5>
- Montañez, A., Blanco, A.R., Barlocco, C., Beracochea, M., Sicardi, M., 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Appl. Soil Ecol.* 58, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.009>
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., Someya, T., 2019. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon* 5, e01817. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., Someya, T., 2019. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon* 5, e01817. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>
- Mrabet, M., Abdellatif, E., Zribi, K., Mhamdi, R., Djebali, N., 2011. *Sinorhizobium meliloti* can protect *Medicago truncatula* from infection by *Phoma medicaginis*. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 183–191. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-8908](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8908)
- Mukhopadhyay, K.; Garrison, N.K.; Hinton, D.M.; Bacon, C.W.; Khush, G.S.; Peck, H.D.; Datta, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia* 1996, 134, 151–159.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F.B., Squartini, A., 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 383–400. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x>
- Nassr, S., & Barakat, R. (2013). Effect of factors on conidium germination of *Botrytis cinerea* in vitro. *METHODS*, 67, 68.
- Nationale, E., n.d. Méthode d'infection artificielle pour la sélection de la luzerne 1–2.
- Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D., 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 291–296. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00605-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00605-9)

- Nawrocka, J., Małolepsza, U., Szymczak, K., Szczech, M., 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma* 255, 359–373. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1157-1>
- Negahi, A., Ben, C., Gentzbittel, L., Maury, P., Nabipour, A. R., Ebrahimi, A., ... & Rickauer, M. (2014). Quantitative trait loci associated with resistance to a potato isolate of *V. dicerii* in *M. truncatula*. *Plant pathology*, 63(2), 308-315.
- Neill, N.R.O., Bauchan, G.R., Samac, D.A., Paul, S., Madison, W., 2003. Reactions in the Annual *Medicago* spp . Core Germ Plasm Collection to *Phoma medicaginis*.
- Nelson, S.K., Ariizumi, T., Steber, C.M., 2017. Biology in the dry seed: Transcriptome changes associated with dry seed dormancy and dormancy loss in the arabidopsis GA-insensitive *sleepy1-2* mutant. *Front. Plant Sci.* 8, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02158>
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens.
- Palaniappan, P., Chauhan, P.S., Saravanan, V.S., Anandham, R., Sa, T., 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol. Fertil. Soils* 46, 807–816. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0485-5>
- Panpatte, D.G., Shukla, Y.M., Shelat, H.N., Vyas, R. V., Jhala, Y.K., 2017. Bacterial Volatile Organic Compounds: A New Insight for Sustainable Agriculture 1, 151–166. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4_8)
- Panthee, D., Chen, F., 2009. Genomics of Fungal Disease Resistance in Tomato. *Curr. Genomics* 11, 30–39. <https://doi.org/10.2174/138920210790217927>
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>
- Park, Y.H., Chandra Mishra, R., Yoon, S., Kim, H., Park, C., Seo, S.T., Bae, H., 2019. Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. *J. Ginseng*

- Res. 43, 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.03.002>
- Partida-Martínez, L.P., Heil, M., 2011. The microbe-free plant: Fact or artifact? *Front. Plant Sci.* 2, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>
- Pavithra, G., Bindal, S., Rana, M., Srivastava, S., 2020. Role of endophytic microbes against plant pathogens: A review. *Asian J. Plant Sci.* 19, 54–62. <https://doi.org/10.3923/ajps.2020.54.62>
- Pedraza, R.O., Bellone, C.H., Carrizo de Bellone, S., Boa Sorte, P.M.F., Teixeira, K.R. dos S., 2009. Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.007>
- Pérez-García, A., Romero, D., de Vicente, A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Piechulla, B., Lemfack, M.C., Kai, M., 2017. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant Cell Environ.* 40, 2042–2067. <https://doi.org/10.1111/pce.13011>
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species.
- Pirhadi, M., Enayatizamir, N., Motamedi, H., & Sorkheh, K. (2018). Impact of soil salinity on diversity and community of sugarcane endophytic plant growth promoting bacteria (*Saccharum officinarum* L. Var. CP48). *Appl Ecol Environ*, 16, 725-739.
- Piromyou, P., Greetatorn, T., Teamtisong, K., Okubo, T., Shinoda, R., Nuntakij, A., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Minamisawa, K., Teaumroong, N., 2015. Preferential association of endophytic bradyrhizobia with different rice cultivars and its implications for rice endophyte evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3049–3061. <https://doi.org/10.1128/AEM.04253-14>

- Pirttil, A.M., 2011. Dark Septate Endophytes and Mycorrhizal. Endophytes For. Trees Biol. Appl. 189–201. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1599-8>
- Puente, M.E., Li, C.Y., Bashan, Y., 2009a. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. Environ. Exp. Bot. 66, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.007>
- Puente, M.E., Li, C.Y., Bashan, Y., 2009b. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. Environ. Exp. Bot. 66, 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.010>
- Quadt-Hallmann, A., Benhamou, N., Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in cotton: Mechanisms of entering the plant. Can. J. Microbiol. 43, 577–582. <https://doi.org/10.1139/m97-081>
- Raaijmakers, J.M., Mazzola, M., 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 50, 403–424. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F.J., Algar, E., Lucas García, J.A., García-Villaraco, A., Ramos Solano, B., 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 104, 321–330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Rafińska, K., Pomastowski, P., Wrona, O., Górecki, R., Buszewski, B., 2017. Medicago sativa as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. Phytochem. Lett. 20, 520–539. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.006>
- Rahman, A.H.M.M., Parvin, M.I.A., 2014. Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi, Bangladesh. Res. Plant Sci. 2, 6–8. <https://doi.org/10.12691/plant-2-1-2>
- Raza, W., Ling, N., Liu, D., Wei, Z., Huang, Q., Shen, Q., 2016. Volatile organic compounds produced by Pseudomonas fluorescens WR-1 restrict the growth and virulence traits of Ralstonia solanacearum. Microbiol. Res. 192, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.014>
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., Hurek, T., 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte Azoarcus Sp. strain BH72. Mol. Plant-Microbe Interact. 19, 181–188. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0181>
- Rekosz-Burlaga, H., Borys, M., Goryluk-Salmonowicz, A., 2014. Cultivable microorganisms

- inhabiting the aerial parts of *Hypericum perforatum*. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 13, 117–129.
- Reyes, A., Rincón, G., López, L., Evangelista, Z., Quiñones, E., 2015. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Rev. Digit. Univ. UNAM* 16, 1–15.
- Rho, H., & Kim, S. H. (2017). Endophyte effects on photosynthesis and water use of plant hosts: a meta-analysis. In *Functional Importance of the Plant Microbiome* (pp. 43-69). Springer, Cham.
- Ringelberg, D.; Foley, K.; Reynolds, C.M. Bacterial endophyte communities of two wheatgrass varieties following propagation in different growing media. *Can. J. Microbiol.* **2012**, 58, 67–80.
- Romanazzi, G., & Droby, S. (2016). Control strategies for postharvest grey mould on fruit crops. In *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 217-228). Springer, Cham.
- Roman-Reyna, V., Pinili, D., Borja, F.N., Quibod, I.L., Groen, S.C., Alexandrov, N., Mauleon, R., Oliva, R., 2020. Characterization of the Leaf Microbiome from Whole-Genome Sequencing Data of the 3000 Rice Genomes Project. *Rice* 13, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00432-1>
- Romero, F.M., Marina, M., Pieckenstein, F.L., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 187–94. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12377>
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 827–837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
- Rostás, M., Cripps, M.G., Silcock, P., 2015. Aboveground endophyte affects root volatile emission and host plant selection of a belowground insect. *Oecologia* 177, 487–497. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3104-6>
- Rouissi, W., Ugolini, L., Martini, C., Lazzeri, L., Mari, M., 2013. Control of postharvest fungal pathogens by antifungal compounds from *penicillium expansum*. *J. Food Prot.* 76, 1879–1886. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-072>
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N., 2008. Bacterial

- endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 1–9.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- Ryu, C., Farag, M.A., Hu, C., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Pare, P.W., 2004. Bacterial volatiles induced resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134, 1017–1026.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>.with
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Laschat, S., Bilitewski, U., Blodgett, J., Duhme Klair, A., Dallavalle, S., Routledge, A., & Schobert, R. (2017). Chemical and Biological Aspects of Nutritional Immunity-Perspectives for New Anti-Infectives that Target Iron Uptake Systems.*
- Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL (2013) Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol* 53:303–317
- Sahu, P.P., Puranik, S., Khan, M., Prasad, M., 2012. Recent advances in tomato functional genomics: Utilization of VIGS. *Protoplasma* 249, 1017–1027.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-012-0421-7>
- Saikkonen, K.; Saari, S.; Helander, M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Divers.* **2010**, 41, 101–113.
- Sakakibara, H., 2006. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 431–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Salinas, J., Glandorf, D.C.M., Picavet, F.D., Verhoeff, K., 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands J. Plant Pathol.* 95, 51–64.  
<https://doi.org/10.1007/BF02000882>
- Samad, M.S., Johns, C., Richards, K.G., Lanigan, G.J., de Klein, C.A.M., Clough, T.J., Morales, S.E., 2017. Response to nitrogen addition reveals metabolic and ecological strategies of soil bacteria. *Mol. Ecol.* 26, 5500–5514. <https://doi.org/10.1111/mec.14275>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sang, M.K., Kim, K.D., 2012. The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain

- GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper. *J. Appl. Microbiol.* 113, 383–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05330.x>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Schlaeppli, K.; Bulgarelli, D. The Plant Microbiome atWork. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2015**, 212, 212–217.
- Schliep, K., Potts, A.J., Morrison, D.A., Grimm, G.W., 2017. Intertwining phylogenetic trees and networks. *Methods Ecol. Evol.* 8, 1212–1220. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12760>
- Schliep, K.P., 2011. phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are endophytes?. In *Microbial root endophytes* (pp. 1-13). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schulz, B., Boyle, C., 2014. What are Endophytes? <https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9>
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Seidl, V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol. Rev.* 22, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>
- Selim, H.M.M., Gomaa, N.M., Essa, A.M.M., 2017. Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales: ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. *Biocontrol Sci. Technol.* 27, 81–95. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1258452>
- Serrato, R. V., Sasaki, G.L., Cruz, L.M., Carlson, R.W., Muszyński, A., Monteiro, R.A., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Iacomini, M., 2010. Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus *Herbaspirillum*. *Can. J. Microbiol.* 56, 342–347. <https://doi.org/10.1139/W10-011>

- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A. V., Vandamme, P., Barka, E.A., Salles, J.F., Van Elsas, J.D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., Wang-Pruski, G., Nowak, J., 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1187–1192. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., Van Overbeek, L., Brar, D., Van Elsas, J.D., Reinhold-Hurek, B., 2012. Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>
- Shafi, J., Tian, H., Ji, M., 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol. Equip.* 31, 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shahzad, R., Khan, A.L., Bilal, S., Asaf, S., Lee, I.J., 2018. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front. Plant Sci.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00024>
- Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R., 2016. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Vol. 1: Research perspectives. *Microb. Inoculants Sustain. Agric. Product. Vol. 1 Res. Perspect.* 1–343. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5>
- Singh, M., Meenakshi, S., Kumar, A., Singh, A.K., Pandey, K.D., 2020. Endophytic bacteria in plant disease management. In: Kumar, A., Singh, V.K. (Eds.), *Microbial Endophytes: Prospects for Sustainable Agriculture*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818734-0.00004-8>.
- Sinorhizobium meliloti* can protect *Medicago truncatula* from infection by *Phoma medicaginis*, 2011. 183–191.
- Slimene, I. Ben, Tabbene, O., Gharbi, D., Mnasri, B., Schmitter, J.M., Urdaci, M.C., Limam, F., 2015. Isolation of a Chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 Strain Exerting a Biological Control Against *Phoma medicaginis* Infection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 3494–3506. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1520-7>
- Slimene, I. Ben, Tabbene, O., Gharbi, D., Mnasri, B., Schmitter, J.M., Urdaci, M.C., Limam,

- F., 2015. Isolation of a Chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 Strain Exerting a Biological Control Against *Phoma medicaginis* Infection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 3494–3506. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1520-7>
- Sousa, J.A. de J., Olivares, F.L., 2016. Plant growth promotion by streptomycetes: Ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0073-5>
- Spadaro, D., Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stevens, R.B. 1960. Pages 357-429 in: *Plant Pathology, an Advanced Treatise*, Vol. 3. J.G. Horsfall and A.E. Dimond, eds. Academic Press, NY.
- Straub, D., Rothballer, M., Hartmann, A., Ludewig, U., 2013. The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. *Front. Microbiol.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00168>
- Sun, Y., Cheng, Z., Glick, B.R., 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01625.x>
- Surjit, S.D., Rupa, G., 2014. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. *African J. Microbiol. Res.* 8, 1562–1572. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6541>
- Syed Ab Rahman, S.F., Singh, E., Pieterse, C.M.J., Schenk, P.M., 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci.* 267, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Taha, M.D.M., Jaini, M.F.M., Saidi, N.B., Rahim, R.A., Shah, U.K.M., Hashim, A.M., 2019. Biological control of *Erwinia mallotivora*, the causal agent of papaya dieback disease by

- indigenous seed-borne endophytic lactic acid bacteria consortium. *PLoS One* 14, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224431>
- Taulé, C., Vaz-Jauri, P., Battistoni, F., 2021. Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02966-4>
- Thakkar, A., Saraf, M., 2015. Development of microbial consortia as a biocontrol agent for effective management of fungal diseases in *Glycine max* L. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 48, 459–474. <https://doi.org/10.1080/03235408.2014.893638>
- Tiwari, R., Kalra, A., Darokar, M.P., Chandra, M., Aggarwal, N., Singh, A.K., Khanuja, S.P.S., 2010. Endophytic bacteria from *ocimum sanctum* and their yield enhancing capabilities. *Curr. Microbiol.* 60, 167–171. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9520-x>
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Katinakis, P., 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 35–44. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000010132.91241.cb>
- Toh, S.C., Samuel, L., Awang, A.S.A.H., 2016. Screening for antifungal-producing bacteria from *Piper nigrum* plant against *Phytophthora capsici*. *Int. Food Res. J.* 23, 2616–2622.
- Toueni, M., Ben, C., Le Ru, A., Gentzbittel, L., & Rickauer, M. (2016). Quantitative resistance to *Verticillium* wilt in *Medicago truncatula* involves eradication of the fungus from roots and is associated with transcriptional responses related to innate immunity. *Frontiers in plant science*, 7, 1431.
- Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., Sessitsch, A., Zitouni, A., 2016. Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African J. Bot.* 105, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.020>
- Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., Vangronsveld, J., 2015. Bacterial seed endophytes:

- Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 40–50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>
- Tsuda, K., Kosaka, Y., Tsuge, S., Kub, Y., Horin, A.O., 2001. Evaluation of the endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 isolated from spinach roots for biological control against Fusarium wilt of spinach. *J. Gen. Plant Pathol.* 67, 78–84.
- Urbasch, I. (1983). On the genesis and germination of the chlamyospores of *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathologische Zeitschrift*, 108(1), 54-60.
- Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., Choudhary, D.K., 2015. Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L. Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. *J. Appl. Microbiol.* 119, 539–551. <https://doi.org/10.1111/jam.12866>
- Vaishnav, A., Shukla, A.K., Sharma, A., Kumar, R., Choudhary, D.K., 2019. Endophytic Bacteria in Plant Salt Stress Tolerance: Current and Future Prospects. *J. Plant Growth Regul.* 38, 650–668. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9880-1>
- Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11, 296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>
- Vaseekaran, S., Balakumar, S., Arasaratnam, V., 2011. Isolation and Identification of a Bacterial Strain Producing Thermostable  $\alpha$ - Amylase. *Trop. Agric. Res.* 22, 1. <https://doi.org/10.4038/tar.v22i1.2603>
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.F., Jacques, M.A., Lebrun, M.H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.A., Roumagnac, P., Candresse, T., 2014. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome new concepts in the light of meta-omics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00029>
- Veselova, M.A., Plyuta, V.A., Khmel, I.A., 2019. Volatile Compounds of Bacterial Origin: Structure, Biosynthesis, and Biological Activity. *Microbiol. (Russian Fed.)* 88, 261–274. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030160>
- Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I.,

- Parra-Cota, F.I., De los Santos-Villalobos, S., 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Rev. Mex. Fitopatol. Mex. J. Phytopathol.* 36. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- VIRET, O., BLOESCH, B., DUBUIS, P.-H., GINDRO, K., 2010. Epidémiologie de *Botrytis cinerea* et stratégies de lutt. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 42, 162–167.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828-840.
- Vos, M., Velicer, G.J., 2006. Genetic population structure of the soil bacterium *Myxococcus xanthus* at the centimeter scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3615–3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3615-3625.2006>
- Vos, M., Wolf, A.B., Jennings, S.J., Kowalchuk, G.A., 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 936–954. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12023>
- Wagner, M.R., Lundberg, D.S., Del Rio, T.G., Tringe, S.G., Dangl, J.L., Mitchell-Olds, T., 2016. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nat. Commun.* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12151>
- Waldor, M.K., Tyson, G., Borenstein, E., Ochman, H., Moeller, A., Finlay, B.B., Kong, H.H., Gordon, J.I., Nelson, K.E., Dabbagh, K., Smith, H., 2015. Where Next for Microbiome Research? *PLoS Biol.* 13, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002050>
- Walitang, D.I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y.K., Kang, Y., Sa, T., 2017. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiol.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>
- Walker, J. (1990). *Verticillium albo-atrum* in Australia: a case study of information confusion in plant pathology. *Australasian Plant Pathology*, 19(3), 57-67.
- Wan, J., Tanaka, K., Zhang, X.C., Son, G.H., Brechenmacher, L., Nguyen, T.H.N., Stacey, G., 2012. LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and

- plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 160, 396–406.  
<https://doi.org/10.1104/pp.112.201699>
- Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., Chen, M., Wang, Y., Huang, Y., Cui, H., 2013. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 341, 45–51. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12088>
- Wang, S., Hu, T., Jiao, Y., Wei, J., Cao, K., 2009. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* EB-28, an endophytic bacterium strain displaying biocontrol activity against *Botrytis cinerea* Pers. *Front. Agric. China* 3, 247–252. <https://doi.org/10.1007/s11703-009-0042-x>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.  
<https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Williamson, B., Duncan, G. H., Harrison, J. G., Harding, L. A., Elad, Y., & Zimand, G. (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 99(11), 1303-1310.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8, 561–580.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Woodford, J. A. T., Williamson, B., & Gordon, S. C. (2001, July). Raspberry beetle damage decreases shelf-life of raspberries also infected with *Botrytis cinerea*. In *VIII International Rubus and Ribes Symposium* 585 (pp. 423-427).
- Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707–735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C., Ma, Y., 2019. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiologyopen* 8, 1–14.  
<https://doi.org/10.1002/mbo3.813>
- Xu, J., Li, X.L., Luo, L., 2012. Effects of engineered *Sinorhizobium meliloti* on cytokinin

- synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8056–8061. <https://doi.org/10.1128/AEM.01276-12>
- Yaish, M.W., Al-Lawati, A., Jana, G.A., Patankar, H.V., Glick, B.R., 2016. Impact of soil salinity on the structure of the bacterial endophytic community identified from the roots of caliph medic (*Medicago truncatula*). *PLoS One* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159007>
- Yang, C., Zhang, X., Shi, G., Zhao, H., Chen, L., Tao, K., Hou, T., 2011. Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. *African J. Microbiol. Res.* 5, 131–136. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.815>
- Yeoh, Y.K.; Dennis, P.G.; Paungfoo-Lonhienne, C.; Weber, L.; Brackin, R.; Ragan, M.A.; Schmidt, S.; Hugenholtz, P. Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. *Nat. Commun.* **2017**, 8.
- Zachow, C., Fatehi, J., Cardinale, M., Tilcher, R., Berg, G., 2010. Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 124–135. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00930.x>
- Zaidi, A., Ahmad, E., Khan, M.S., Saif, S., Rizvi, A., 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 193, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.020>
- Zaidi, A., Khan, M.S., Musarrat, J., 2017. *Microbes for legume improvement*, second edition. *Microbes Legum. Improv. Second Ed.* 1–412. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2>
- Zare, R., Gams, W., 2008. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycol. Res.* 112, 811–824. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.019>
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2010a. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biol. Control* 54, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.003>
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2010b. Efficacy of the antagonist

- Aureobasidium pullulans PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biol. Control* 54, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.003>
- Zhang, J., Xue, Q., Gao, H., Lai, H., Wang, P., 2016. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. *Microb. Cell Fact.* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0574-8>
- Zhang, Xiaoyu, Gao, Z., Zhang, Xinxian, Bai, W., Zhang, L., Pei, H., Zhang, Y., 2020. Control effects of *Bacillus siamensis* G-3 volatile compounds on raspberry postharvest diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. *Biol. Control* 141, 104135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104135>
- Zhao, J., Liu, W., Liu, D., Lu, C., Zhang, D., Wu, H., Dong, D., Meng, L., 2018. Identification and evaluation of *Aspergillus tubingensis* as a potential biocontrol agent against grey mould on tomato. *J. Gen. Plant Pathol.* 84, 148–159. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0764-9>
- Zhao, L.F., Xu, Y.J., Lai, X.H., 2018. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian J. Microbiol.* 49, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.007>
- Zhao, P., Li, P., Wu, S., Zhou, M., Zhi, R., Gao, H., 2019. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. *AMB Express* 9. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0841-2>
- Zhao, P., Li, P., Wu, S., Zhou, M., Zhi, R., Gao, H., 2019. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. *AMB Express* 9. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0841-2>
- Zheng, M., Shi, Jingying, Shi, Jian, Wang, Q., Li, Y., 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biol. Control* 65, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.004>
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A.K., 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2198–2208.

<https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>

### Pages web

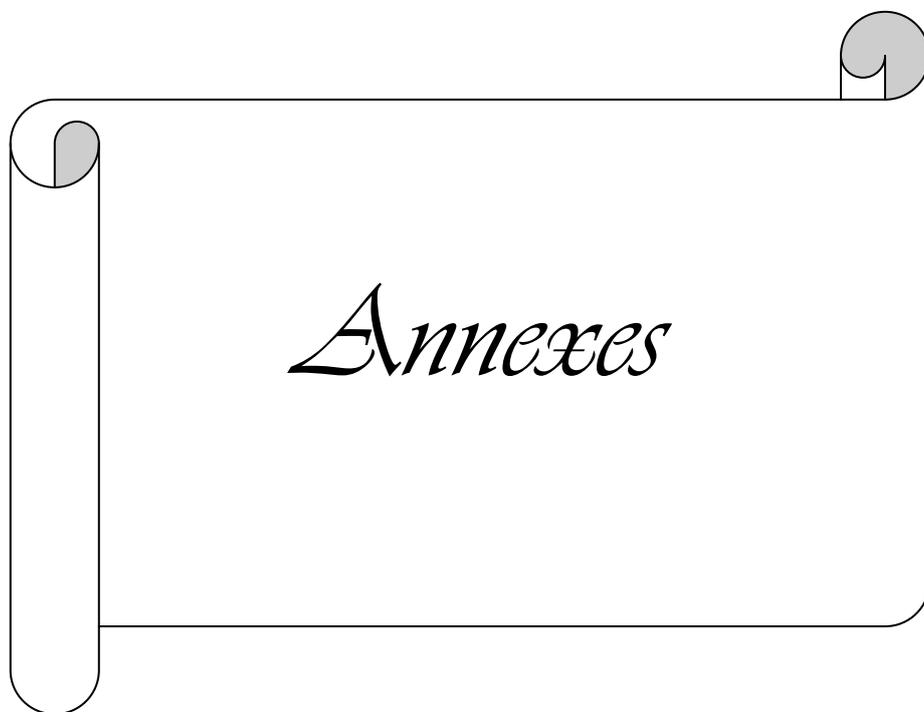
AGRI find (2019), Phoma / Ascochyte sur luzerne. En ligne :  
<https://www.agrifind.fr/alertes/luzerne/luzerne-phoma/>

Berlanger, I. and M.L. Powelson. 2000. Verticillium wilt. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0801-01. Updated 2005. En ligne :  
<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/VerticilliumWilt.aspx>

DISEASES OF ALFALFA - VERTICILLIUM WILT, s.d. En ligne:  
[https://webhosting.cals.wisc.edu/wp-content/blogs.dir/39/files/IPM\\_Scout\\_School\\_Talk/img10.php](https://webhosting.cals.wisc.edu/wp-content/blogs.dir/39/files/IPM_Scout_School_Talk/img10.php)

Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO),s.d. En ligne :  
<http://faostat.fao.org/>

Société [ACTION PIN](https://www.helioterpen.fr/) (2019), Phoma de Colza. En ligne : <https://www.helioterpen.fr/>  
: <https://www.helioterpen.fr/>



**Annexe 1.** Origine des souches bactériennes endophytes de tomate

<b>Code de la souche bactérienne</b>	<b>Site d'origine</b>	<b>Organ d'isolement</b>
BF11	Belyess	Fleur
BF12	Belyess	Fleur
CHF11	Chrifat	Fleur
CHF12	Chrifat	Fleur
DHF14	Diar_Hajjaj	Fleur
DHF1-1	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF1-2	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF2	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF3-1	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF3-2	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF4	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF5	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF6	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF7	Diar_Hajjaj	Feuille
DHF8	Diar_Hajjaj	Feuille
DHP3	Diar_Hajjaj	Pétiole
DHP1	Diar_Hajjaj	Pétiole
DHT1	Diar_Hajjaj	Tige
DHT2	Diar_Hajjaj	Tige
H2F12	Hattouba	Fleur
H2F13	Hattouba	Fleur
H2F14	Hattouba	Fleur
H1Fr2	Hattouba	Fruit
H1Fr3	Hattouba	Fruit
H1F1	Hattouba	Feuille
H1F2	Hattouba	Feuille
H1F9	Hattouba	Feuille
H2F1	Hattouba	Feuille
H2F3	Hattouba	Feuille
H2F4	Hattouba	Feuille
HF4	Hattouba	Feuille
H2P1	Hattouba	Pétiole
H2P2	Hattouba	Pétiole
H2P3	Hattouba	Pétiole
H2P4	Hattouba	Pétiole
H1R2	Hattouba	Racine
H1T1	Hattouba	Tige
H1T2	Hattouba	Tige
H1T3	Hattouba	Tige
H2T2	Hattouba	Tige
H2T3	Hattouba	Tige

**Annexe 1. Suite**

<b>Code de la souche bactérienne</b>	<b>Site d'origine</b>	<b>Organ d'isolement</b>
RK-BKF12	Route Korba_BeniKhaled	Fleur
RK-BKF11	Route Korba_BeniKhaled	Fleur
TF1	Tbag	Feuille
TF2	Tbag	Feuille
TP1	Tbag	Pétiole
TP4	Tbag	Pétiole
TR1	Tbag	Racine
TR2	Tbag	Racine
TR3	Tbag	Racine

**Annexe 2.**Composition du milieu M pour la culture de *Medicago truncatula*.

<b>Solution stock</b>	<b>Produit</b>	<b>Quantité (g/l)</b>	<b>Prise (mL/L de milieu)</b>
<b>Macroéléments et Fe-EDTA</b>	KNO <sub>3</sub>	8	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	73,1	
	KCl	6,5	10
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,48	
	NaFe-EDTA	0,8	
<i>Nitrate de calcium</i>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	28,8	10
<b>Micro-éléments</b>	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	6	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,65	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0024	1
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,13	
	KI	0,75	
<b>Vitamines</b>	Glycine	0,3	
	Myoinosinol	5	
	Acide nicotinique	0,05	10
	Pyridoxine HCl	0,01	
	Thiamine HCl	0,01	
-	<b>Agar</b>	<b>7,5</b>	-

\* Le pH du milieu a été ajusté à 5,5

**Annexe 3. Milieu Sanderson & Srb (Basic Plant Pathology Methods 1995)**

Pour un litre d'eau distillée :

<b>Eléments</b>	<b>Masse (g)</b>
KH <sub>2</sub> PO	2
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,6
NaCl	0,1
Agar	20
NaNO <sub>3</sub>	2,4
Sucrose	10
CaCl <sub>2</sub>	0,1

Un ml de solution micro-élément est ajouté avant la mise d'agar

Pour préparer la solution stock des micro-éléments il faut :

9 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/ 58,5 mg CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O/ 1,95 mg KI/ 9 mg MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O/ 7,6 mg NaMoO<sub>4</sub>/  
822mg ZnSO<sub>4</sub>,6H<sub>2</sub>O/ 139,8 mg FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O dans 300 ml d'eau distillée.

**Annexe 4.** Composés des différents milieux utilisés dans l'activité enzymatique des bactéries endophytes

<b>Composant</b>	<b>Quantité (g/L)</b>
<b>Milieu Luria Bertani (LB) solide</b>	
Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	5
Agar	5
<b>Milieu minimum</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
NaCl	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01
Extrait de levure	1
Agar	20
<b>Milieu de gélose cellulosique à pH entre 6,8-7,2</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub>	0,25
Cellulose	2
Agar	15
Gélatine	2

#### Annexe 4. Suite

<b>Milieu agar de pectine à pH=5</b>	
Pectine	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
NaCl	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01
Extraitdelevure	1
Agar	20
<b>Iodure de Potassium Iodide (Lugol)</b>	
I <sub>2</sub>	3,03
KI	15,15

#### Annexe 5. Composition de milieu CAS pour détecter la capacité des bactéries à produire des sidérophores

<b>Milieu CAS</b>		
<b>Mélanges</b>	<b>Solution</b>	<b>Composition</b>
Mélange1(M1) : S1+S2(9ml)+S3(colorantbleu)	Solution1(S1)	0,06gCAS/50mldeH <sub>2</sub> O(H <sub>2</sub> O bi-distillée)
	Solution2(S2)	0,0027gFeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O/10mlHCl(10mM)
	Solution3(S3)	0,073gHDTMA/40mldeH <sub>2</sub> O
Mélange2(M2) : mélangedessolutions	Solution4(S4)solution desel : MinimalMedia9(MM9 )	15gdeKH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,25gNaCl et50gdeNH <sub>4</sub> Cl/500mldeH <sub>2</sub> O
	Solution5(S5)glycémi e20%	20gdeglucose/100mldeH <sub>2</sub> O
	Solution6(S6)NaOH	25gdeNaOH/150mldeH <sub>2</sub> O;Le pHdevrait êtrede~12

	Solution7(S7)CASaminoAcide	3gdeCASaminoAcide/27mldeH2O. 3%de8-hydroxyquinoléine/chloroforme.
Mélange3(M3) : préparationdeGélose(chromeazuroS(CAS))	Solution8(S8)	100mldeMM9/750mldeH2O. 32,24gd'acidepipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique)PIPESàpH=6. 15gd'agardeBacto. 30mldeS7et10mldeS5à20%enmélangeMM9/PIPES. 100mldesolutioncolorantbleu.

**Annexe 6.** Composition de milieu PVK pour détecter la capacité des bactéries à solubiliser le phosphate

Composition de milieu PVK (Pikovskaya, 1948)	
Composition	Quantité (g/ml)
Glucose	10
Extrait de levure	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
Sulfate de Magnésium (MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O)	0,1
Phosphate de calcium (Ca <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	5
NaCl	0,2
KCl	0,2
MnSO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,002
FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,002
Agar	1,5

**Annexe 7.** Analyse d'enrichissement de la collection des bactéries endophytes produisant des COV contre *B.cinerea* (S2 et S5)

<b>Espèces des bactéries endophytes</b>	<b>Nombre de souches</b>	<b>Nombre de souches avec activité antifongique contre S2</b>	<b>Nombre de souches avec activité antifongique contre S5</b>
<i>Bacillus velezensis</i>	5	2	4
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2	2	1
<i>Bacillus subtilis</i>	2	2	0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	1	1
<i>Bacillus nakamurai</i>	1	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	1
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	1	1	0
<i>Bcillusvallismortis</i>	1	1	0
<i>Enterobacterasburiae</i>	1	1	0
<i>Bacillus proteolyticus</i>	1	0	1
<i>Bacillus toyonensis</i>	1	0	1
<b>Total nombre des souches</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>10</b>

**Annexe 8.** Liste des amorces utilisées dans l'étude de l'expression des gènes dans les plantes de *M.truncatula* infectées par *P.medicaginis*

Gène	Séquence
MtDefMd1F	GCTTCCTCTGCTCTTAATA
MtDefMd1R	TGTTGCCGGTGGTTCCTTAC
MtDefMd2F	AAAGGAAAAGCACAAACATGG
MtDefMd2R	CAGAAGCAAGCAAATCCAAA
MtEF $\alpha$ F	AAGCTAGGAGGTATTGACAAG
MtEF $\alpha$ R	ACTGTGCAGTAGTACTTGGTG
MtCHIF	ATGGCCAAACTCCAACTCTAAA
MtCHIR	ATTGAGGTGCTGCAGACAAGTA
MtPR4F	GGTGATGCATATTGTGGCACAGGG
MtPR4R	GCAGCAGCAACCTCACGTTTGGAG
MtPR5F	TGCCTTAGCTTTGCATTCT
MtPR5R	AATTTCCGCTGAGTTCGTTG
MtPR10F	CAGCATAGTTGGTGGTGGTG
MtPR10R	TAGGTGCAGCATCACCTTTG
Mt $\beta$ GlucF	CAAATTGGGTCCAAAAATATGTGAC
Mt $\beta$ GlucR	GCACCATCATTGGGTGGATATGAAG
MtPALF	GAATTGCTTCCCATGATAGTGGTGTAG
MtPALR	GGCATTCAAAAACCTAATTAGCTCC
MtLOX1F	ATGAAGAGATGGAGAAAGATGACC
MtLOX1R	GCAAAGTGTAGGGCATCTTAACCG
MtAOS1F	GGACACCGAACTTGGACTTGAC
MtAOS1R	AAACATCCAAACGCTCTGCTTC
MtCAT4F	TTCTTCTTCTCCACCGTCCTCA
MtCAT4R	TCCAAGAGAATTGGACCTCTGG
MtCHR4F	TGGTTGGAATGGGATCAGCCCC
MtCHR4R	TCACCAAGAGCTTGTTCTGAGCCA
MtActinF	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAG
MtActinR	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAA
Mt $\beta$ -tubulinF	GTGGTTTGTGCTGAACATGG
Mt $\beta$ -tubulinR	AACGAACCTTCCACCACTTG



**Annexe 9.** Identification des composés organiques volatiles produits par les bactéries sélectionnées par la technique SPME-GC/MS.

Composés organiques volatiles	Temps de rétention	LBA		BF11		DHT2		H1F1		H2F12		TR1	
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
		_7 j	_14 j	_7 j	_14 j	_7 j	_14 j						
Silanediol, dimethyl	3.709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.46	-
3-Methylpentane	3.799	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.40	-
Isoamyl Alcohol(3-Methylbutan-1-ol)	4.356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80.9	58.8
												1	0
Dimethyldisulfide	4.558	-	-	-	-	-	37.1	-	-	-	-	-	-
							9						
2-Furanmethanol	7.172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-
1-Hexanol	7.410	-	-	-	-	-	1.85	-	-	-	-	-	-

1-Butanol, 3-methyl-, acetate	7.549	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.59
2-Heptanone	7.747	-	-	-	-	-	-	-	-	4.42	0.84	-	-	2.86
Oxime-, methoxy-phenyl	7.938	17.5	6.92	9.29	4.65	14.6	5.66	26.1	14.2	14.7	5.01	2.57	3.27	
		3				3		6	5	1				
Pyrazine, 2,5-dimethyl	8.062	2.87	0.82	2.25	1.67	1.56	1.98	1.00	-	2.49	2.24	0.45	0.32	
Pyrazine, 2,6-dimethyl	8.066	-	0.94	1.16	2.66	0.11	-	3.32	4.73	1.19	2.49	0.38	0.02	
S-Methyl 3-methylbutanethioate	8.443	-	-	-	-	5.87	3.76	-	-	-	-	-	-	
2-Heptanone	8.637	-	-	-	-	-	-	-	-	0.77	-	-	-	
2-Heptanone, 6-methyl	8.639	-	-	-	-	0.74	-	-	0.74	-	-	-	-	
NI	8.641	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.61
Benzaldehyde	8.719	39.2	50.2	1.36	2.33	-	-	2.73	2.76	1.38	1.25	0.30	-	
		2	1											
NI	8.790	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.31	-
Dimethyltrisulfide	8.834	-	-	-	-	0.98	1.37	-	-	-	-	-	-	3.77
Methionol	8.943	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.28	0.58

Aniline	8.950	-	-	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl	9.060	-	-	-	0.87	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Octanone	9.064	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.87
Cyclohexanol, 4-methyl	9.064	-	-	-	-	-	0.56	0.68	2.39	-	-	-	-
NI	9.118	-	-	-	-	0.33	0.26	-	-	-	-	-	-
Cyclohexanol, 4-methyl	9.129	-	-	0.62	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Decane	9.151	-	0.75	0.64	0.97	0.69	1.29	0.69	-	0.61	0.92	0.10	0.32
NI	9.396	-	-	-	-	-	0.32	-	-	-	-	-	-
1-Hexanol, 2-ethyl	9.467	1.47	1.27	2.03	4.27	0.89	0.73	10.8	6.71	1.88	2.29	0.43	0.59
								4					
NI	9.533	-	-	-	-	-	-	-	8.35	-	-	-	-
Benzylalcohol	9.546	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.36
Benzenemethanol	9.547	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	-
Benzeneacetaldehyde	9.654	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.31

NI	9.754	-	-	-	-	-	8.20	-	-	-	-	-	3.07
NI	9.756	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	0.53
Undecane, 5-methyl	9.807	-	-	-	-	-	0.61	-	-	-	-	-	0.75
NI	9.808	-	-	-	-	-	1.69	-	-	-	-	-	-
n-Octan-1-ol	9.875	-	-	-	-	9.25	6.68	-	-	-	-	-	-
1-Octyn-3-ol, 4-ethyl	10.078	-	-	0.84	1.13	-	0.30	3.29	3.09	1.34	1.19	0.08	1.34
Nonane, 5-methyl-5-propyl	10.112	-	-	-	-	-	0.17	-	-	-	-	-	-
Undecane, 4-methyl	10.163	-	-	-	-	-	2.44	-	-	-	-	-	0.92
NI	10.199	-	-	-	-	-	-	0.35	-	-	-	-	-
Decane, 3,7-dimethyl	10.217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.32
$\beta$ -Fenchol	10.322	-	-	0.49	0.69	0.64	0.40	0.72	0.72	0.52	0.56	1.62	2.77
Pyridine, 3-ethyl-4-methyl	10.462	4.35	2.20	5.57	6.38	5.34	3.91	4.74	6.64	2.62	4.50	0.92	2.19
Benzenamine, N-ethyl	10.586	-	-	-	0.74	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclopentane, 1,1,3-trimethyl-3-(2-methyl-2-propenyl)	10.588	0.61	0.41	0.42	-	.82	0.44	0.39	1.48	0.27	0.43	0.10	0.35

---

2,6-Dimethyldecane	10.625	-	-	-	0.34	-	-	-	-	-	-	-	-
Undecane, 5-methyl	10.626	-	-	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Undecane, 3-methyl	10.752	-	-	-	0.51	-	-	-	-	-	0.37	-	-
1-Nonanol	10.754	-	-	0.21	0.26	0.78	1.33	-	-	0.35	-	-	-
Cyclopentane, 1,1,3-trimethyl-3-(2-methyl-2-propenyl)	10.846	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-
Cycloheptane, 1-methyl-4-methylene	10.859	13.4	8.61	16.8	13.5	16.3	10.0	14.3	21.7	9.34	9.96	3.01	7.21
		0		5	6	9	8	0	0				
Cyclopentane, 1-hexyl-3-methyl	10.942	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.61
Dodecane	10.984	2.34	3.29	12.9	12.3	4.71	3.57	5.67	5.26	10.4	8.61	0.67	1.16
				7	3					3			
NI	11.312	-	-	0.35	-	1.04	0.20	-	0.85	0.60	-	0.28	-

---

Benzene, m-di-tert-butyl-	11.466	-	-	-	0.42	0.55	0.87	0.36	-	0.44	-	0.05	0.61
1-Decanol	11.540	-	-	-	-	14.8	6.84	-	-	0.23	0.24	-	-
						0							
Tetradecane, 4-methyl-	11.608	-	0.41	-	-	0.49	1.10	0.25	-	0.24	-	-	0.97
Pentadecane	11.669	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.11
2-Undecanone	11.707	-	-	0.19	-	0.12	-	0.73	0.66	1.19	0.73	-	2.62
2-Pentadecanol	11.755	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.52
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl	11.882	-	-	0.96	1.04	1.99	-	-	1.53	1.15	-	0.46	0.16
(Column/Fiber)													
Octane, 5-ethyl-2-methyl	11.935	-	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-	0.23
2-Dodecanone	12.167	-	-	-	-	-	-	-	-	0.44	0.31	-	
NI	12.385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.32
Tetradecane	12.431	0.56	0.69	1.69	1.92	0.61	0.33	0.98	1.25	1.76	2.15	0.16	0.13
2-Undecanone, 6,10-dimethyl	12.488	0.37	0.34	0.19	0.32	0.37	0.15	0.68	1.20	0.34	0.29	-	0.57
Dodecanal	12.516	-	-	-	-	-	-	-	-	5.54	4.61	-	-

1-Dodecanol	12.930	-	-	-	-	0.55	0.25	-	-	.	.	-	1.60
NI	13.034	-	-	-	-	-	-	-	-	0.65	1.00	-	-
1-Tridecene	13.035	-	-	-	0.68	-	-	-	-	-	-	-	-
NI	13.035	0.36	0.46	-	-	-	-	-	0.67	-	1.68	-	-
NI	13.036	-	-	-	-	-	0.25	0.28	-	-	-	0.16	-
NI	13.037	-	-	-	-	0.73	0.24	-	-	-	-	-	-
NI	13.057	-	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-	-	-
Pentadecane	13.078	0.60	0.85	1.52	1.84	0.81	0.41	1.83	1.81	2.42	2.90	0.10	1.06
Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl	13.251	2.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.75	-
NI	13.333	-	-	-	-	-	-	0.22	0.55	-	-	-	-
NI	13.334	-	-	-	-	0.57	-	0.22	-	0.35	-	0.13	-
NI	13.335	-	-	-	-	-	-	-	0.59	-	-	-	0.31
Hexadecane	13.690	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.29	-	-

Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methylpropyl)	13.985	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.31	-	-	-
Heptadecane	14.267	11.2	17.7	38.7	40.7	10.9	5.87	18.2	17.6	33.0	45.4	1.03	2.11	
		0	7	2	5	2		8	4	6	3			
NI	14.312	-	-	-	-	0.32	-	-	-	-	-	-	-	-
NI	14.313	-	-	-	-	-	-	0.23				0.08	0.19	
1,2,4-Triazol-4-amine, N-(2-thienylmethyl)	14.415	2.63	0.66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,3,5-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-2,8-dione	14.416	-	-	0.40	0.33	1.93	0.65	0.52	0.69	0.45	0.28	0.88	0.78	
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	15.078	-	-	0.17	0.56	0.23	0.16	0.30	0.53	0.27	0.43	0.55	0.91	
NI	15.312	-	0.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

---

NI	15.314	-	-	0.64	0.55	-	-	-	-	-	-	-	-
NI	16.187	-	3.98			-	-	-	-	-	-	-	-
NI	16.432	-	-	-	-	-	-	-	-	0.44	-	-	-

---

**Annexe 10.** Analyse statistique pour l'activité antifongique *in-vitro* (AUGPC) des cellules végétatives consortia bactérien contre *P.medicaginis*

Augmented Design Details	
Number of blocks	"15"
Number of treatments	"165"
Number of check treatments	"4"
Number of test treatments	"161"
Check treatments	"A281, Arq1, DH5a, RCR2011"

ANOVA, Treatment Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block (ignoring Treatments)	14	0.003963	2.831e-04	12.957	< 2e-16 ***
Treatment (eliminating Blocks)	164	0.008507	5.187e-05	2.374	3.87e-10 ***
Treatment: Check	3	0.000166	5.518e-05	2.526	0.0581 .
Treatment: Test and Test vs. Check	161	0.008342	5.181e-05	2.371	4.80e-10 ***
Residuals	246	0.005375	2.185e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

ANOVA, Block Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment (ignoring Blocks)	164	0.010106	6.162e-05	2.820	8.82e-14 ***
Treatment: Check	3	0.000166	5.518e-05	2.526	0.0581 .
Treatment: Test	160	0.009831	6.144e-05	2.812	1.37e-13 ***
Treatment: Test vs. Check	1	0.000109	1.091e-04	4.995	0.0263 *
Block (eliminating Treatments)	14	0.002365	1.689e-04	7.731	1.73e-13 ***
Residuals	246	0.005375	2.185e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Annexe 11.** Analyse statistique pour l'activité antifongique *in-vitro* (AUGPC) des des cellules végétatives des consortia bactériens contre *V.alfalfae*

Augmented Design Details	
Number of blocks	"15"
Number of treatments	"165"
Number of check treatments	"4"
Number of test treatments	"161"
Check treatments	"A281, Arq1, DH5a, RCR2011"

ANOVA, Treatment Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block (ignoring Treatments)	14	0.003963	2.831e-04	12.957	< 2e-16 ***
Treatment (eliminating Blocks)	164	0.008507	5.187e-05	2.374	3.87e-10 ***
Treatment: Check	3	0.000166	5.518e-05	2.526	0.0581 .
Treatment: Test and Test vs. Check	161	0.008342	5.181e-05	2.371	4.80e-10 ***
Residuals	246	0.005375	2.185e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

ANOVA, Block Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment (ignoring Blocks)	164	0.010106	6.162e-05	2.820	8.82e-14 ***
Treatment: Check	3	0.000166	5.518e-05	2.526	0.0581 .
Treatment: Test	160	0.009831	6.144e-05	2.812	1.37e-13 ***
Treatment: Test vs. Check	1	0.000109	1.091e-04	4.995	0.0263 *
Block (eliminating Treatments)	14	0.002365	1.689e-04	7.731	1.73e-13 ***
Residuals	246	0.005375	2.185e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Annexe 12.** Analyse statistique pour l'activité antifongique *in-vitro* (AUGPC) des filtrats des consortia bactériens contre *P.medicaginis*

Augmented Design Details	
Number of blocks	"15"
Number of treatments	"165"
Number of check treatments	"4"
Number of test treatments	"161"
Check treatments	"A281, Arq1, DH5a, RCR2011"

ANOVA, Treatment Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block (ignoring Treatments)	14	0.002355	1.682e-04	7.575	4.79e-13 ***
Treatment (eliminating Blocks)	164	0.004354	2.655e-05	1.196	0.1058
Treatment: Check	3	0.000032	1.051e-05	0.473	0.7011
Treatment: Test and Test vs. Check	161	0.004323	2.685e-05	1.209	0.0932 .
Residuals	231	0.005129	2.220e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

ANOVA, Block Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment (ignoring Blocks)	164	0.006048	3.688e-05	1.661	0.000194 ***
Treatment: Check	3	0.000032	1.051e-05	0.473	0.701097
Treatment: Test	160	0.006004	3.753e-05	1.690	0.000132 ***
Treatment: Test vs. Check	1	0.000012	1.191e-05	0.536	0.464655
Block (eliminating Treatments)	14	0.000661	4.724e-05	2.128	0.011352 *
Residuals	231	0.005129	2.220e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Annexe 13.** Analyse statistique pour l'activité antifongique *in-vitro* (AUGPC) des filtrats des consortia bactériens contre *P.medicaginis*

Augmented Design Details	
Number of blocks	"15"
Number of treatments	"165"
Number of check treatments	"4"
Number of test treatments	"161"
Check treatments	"A281, Arq1, DH5a, RCR2011"

ANOVA, Treatment Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block (ignoring Treatments)	14	0.001460	1.043e-04	4.348	7.27e-07 ***
Treatment (eliminating Blocks)	164	0.004907	2.992e-05	1.248	0.0606 .
Treatment: Check	3	0.000015	4.960e-06	0.207	0.8917
Treatment: Test and Test vs. Check	161	0.004892	3.039e-05	1.267	0.0495 *
Residuals	233	0.005588	2.398e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

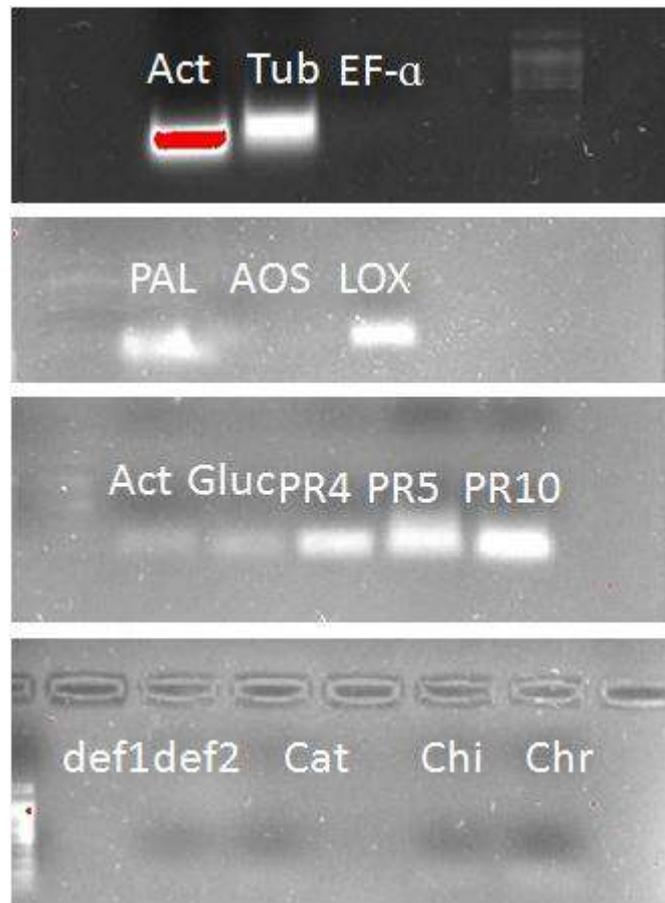
ANOVA, Block Adjusted					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment (ignoring Blocks)	164	0.005270	3.213e-05	1.340	0.0202 *
Treatment: Check	3	0.000015	4.960e-06	0.207	0.8917
Treatment: Test	160	0.005255	3.284e-05	1.369	0.0143 *
Treatment: Test vs. Check	1	0.000000	2.200e-07	0.009	0.9245
Block (eliminating Treatments)	14	0.001097	7.838e-05	3.268	9.12e-05 ***
Residuals	233	0.005588	2.398e-05		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

#### Annexe 14. Résultats de la PCR quantitative

Avant de procéder à la PCR quantitative, on a eu recours à la PCR semi-quantitative pour s'assurer que les gènes cibles pouvaient être amplifiés avec les amorces que nous avons désignées (Annexe 11). Une amplification a été obtenue pour les gènes de ménage Actine et  $\beta$ -Tubuline mais pas pour le facteur d'élongation EF- $\alpha$ . Pour les gènes d'intérêt, une amplification a été obtenue pour les gènes PAL, LOX, PR4, PR5 et PR10 mais pas pour les gènes AOS,  $\beta$ -Gluc, DefMd 1, DefMd 2, Chi, Chr et Cat (Figure 47).



Amplification PCR des gènes de ménage (Actine,  $\beta$ -Tubuline et EF- $\alpha$ ) et les gènes d'intérêt (PAL, AOS, LOX, PR4, PR5, PR10, def1, def2, Cat, Chi et Chr) pour analyser l'efficacité des amorces désignées.



## Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*

Manel Chaouachi<sup>a,b,c</sup>, Takwa Marzouk<sup>a,b</sup>, Selim Jallouli<sup>b</sup>, Salem Elkahoui<sup>b,d</sup>, Laurent Gentzbittel<sup>c,e</sup>, Cécile Ben<sup>c,\*</sup>, Naceur Djébali<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> University of Tunis El Manar, Faculty of Mathematical, Physical and Natural Sciences of Tunis, 2092, Tunis, Tunisia

<sup>b</sup> Laboratory of Bioactive Substances, Centre of Biotechnology of Borj Cedria, BP 901, Hammam-Lif, 2050, Tunisia

<sup>c</sup> Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France

<sup>d</sup> Department of Biology, College of Sciences, University of Ha'il, Ha'il, PO Box 2440, 81451, Saudi Arabia

<sup>e</sup> Digital Agriculture Laboratory, Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoy Boulevard 30 bld.1, Skolkovo, Moscow Region 121205, Russian Federation

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Antifungal activity  
Endophytic bacteria  
Gray mold disease  
Plant growth promoting activity  
*Solanum lycopersicum*  
Volatile organic compounds  
Gas chromatography–mass spectrometry

### ABSTRACT

*Botrytis cinerea* is one of the most important postharvest fungal pathogens causing significant losses in fresh fruits, vegetables and ornamentals. Synthetic fungicides are primarily used to control postharvest decay loss, but due to their hazardous use the recent trend is shifting toward safer and more eco-friendly alternatives. The use of antagonistic microorganisms is becoming popular throughout the world. This study investigated the antifungal, the plant growth promoting activities and the identity of volatile organic compounds (VOCs) produced by tomato-derived endophytic bacteria strains. The capacity of selected strains to prevent postharvest *B. cinerea* infection on tomato fruit through VOCs and soluble compounds was also studied. A collection of 50 bacterial strains was established from different organs of tomato plants sampled from six localities in Cape Bon region (Tunisia). Despite the small geographical scale, complexity and abundance of endophytic communities varied greatly according to the site of origin. Healthy tomato plants harbor diverse endophytic bacteria of *Bacillus* and *Enterobacter* genera colonizing mainly leaves with a significant enrichment with *Bacillus* strains. The *in vitro* dual culture assays showed that 36 % of the endophytic bacterial strains produce antifungal VOCs against *B. cinerea*. To our knowledge, this is the first report of VOCs antifungal activity produced by *B. nakamurai*, *B. pseudomycoloides*, *B. proteolyticus*, *B. thuringiensis*, *E. asburiae* and *E. cloacae* against *B. cinerea*. About 14 % of bacterial strains produce VOCs with *in vitro* specific promoting effects on tomato seedling length or biomass production. The five selected antagonistic endophytic bacterial strains produced a core set of seven VOCs along with different strain-specific and known antifungal VOCs such as 3-Methylbutan-1-ol, sulfur-containing compounds, 2-Heptanone and Dodecanal. Tomato fruit bio-protection assay showed that the *Enterobacter* strain TR1 produces the most protective VOCs against *B. cinerea* infection with 3-Methylbutan-1-ol as a major volatile compound which totally suppressed *B. cinerea* growth and infection on tomato fruit at 0.442 mL L<sup>-1</sup> headspace, whereas the *Bacillus* strains showed better protection against fungal infection when applied as vegetative cells on tomato fruit. These results support the use of the selected strains as potential biocontrol agents to reduce postharvest decay of *B. cinerea*, as well as 3-Methylbutan-1-ol as promising antifungal volatile to apply during postharvest commercialization of tomato fruit.

**Abbreviations:** CFU, Colony Forming Unit; ITS, Internal Transcribed Spacer; GC–MS, Gas Chromatography–Mass Spectrometry; LB, Luria Bertani; PDA, Potato Dextrose Agar; PGP, Plant Growth Promotion; SPME-GC–MS, Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography–Mass Spectrometry; VOC, Volatile Organic Compound.

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [cecile.ben@toulouse-inp.fr](mailto:cecile.ben@toulouse-inp.fr) (C. Ben), [dnaceur2014@gmail.com](mailto:dnaceur2014@gmail.com) (N. Djébali).

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111389>

Received 21 May 2020; Received in revised form 6 September 2020; Accepted 18 October 2020

0925-5214/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Botrytis cinerea* is a necrotrophic fungal pathogen that infects over 1400 plant species (Williamson et al., 2007; Fillingner and Elad, 2015), leading to serious economic losses in agricultural sector (Dean et al., 2012). Annual economic losses due to this disease are evaluated up to 100 billion dollars worldwide (Jin and Wu, 2015). This pathogen infects all aboveground parts of the plants and constitutes a threat during crop season and during storage and transport of vegetables and fruit. Several management methods have been used to control this disease such as cultural methods, but the most common way is the use of chemical fungicides such as folpel, dichlofluanid and thiram on several crops including tomato. However, due to its high genetic variability, prolific reproduction and short life cycle, *B. cinerea* is considered a high-risk pathogen for the development of fungicide resistance (Williamson et al., 2007; Haidar et al., 2017; Saito et al., 2019). In addition, the abusive use of these chemicals has serious hazardous effects on human health, mainly when used to control postharvest infection of *B. cinerea* on vegetables and fruit. Over the past 15 years, research trends are moving toward the prospection of eco-friendly methods to control *B. cinerea* including the use of biological control agents and their active compounds (Combrinck et al., 2011; Abbey et al., 2019). Among the wide range of biocontrol microbial agents, endophytes and especially endophytic bacteria are showing significant potential in fungal disease management (Latha et al., 2019; Singh et al., 2020). Endophytic bacteria are microorganisms living within plant tissues without causing any harmful effect and they are generally considered as beneficial organisms for their hosts (Bolívar-Anillo et al., 2019). Endophytic bacteria can promote plant growth by enhancing several mechanisms such as nutrient uptake and phytohormones production (Vacheron et al., 2013; Van Kan et al., 2014). These endophytes are known also to enhance plant health by modulating plant immune system (Santoyo et al., 2016) and/or by direct inhibition of pathogens through the production of active soluble (antibiotics and lytic enzymes) and volatile compounds (Compant et al., 2005; Nair and Padmavathy, 2014; Haidar et al., 2017). Volatile organic compounds (VOCs) produced by bacteria have low molecular weight and polarities and diffuse easily through the porous structure of soil and over great distances in the atmosphere. As such, they have good properties to be used in crop protection in the field as well as under greenhouses and storage environments (Arrarte et al., 2017). Indeed, several studies showed the potential use of bacterial VOCs in plant disease management (Agisha et al. 2019; Dhoub et al., 2019) and in particular in postharvest disease control (Elkahoui et al., 2015; Zheng et al., 2019; Calvo et al., 2020). Several bacterial endophytes have shown the production of antifungal VOCs; among these, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Enterobacter* are well known genera (Tsuda et al., 2001; Agisha et al. 2019; Dhoub et al., 2019; Singh et al., 2020) producing chemical volatiles belonging to different groups such as aldehydes, alcohols, terpenes, esters, ketones, hydrocarbons, nitrogen-containing heterocycles, sulfur derivatives and acids (Elkahoui et al., 2015; Agisha et al. 2019; Dhoub et al., 2019).

The present study aims to prospect and select endophytic bacteria strains with VOCs antagonistic activity against *B. cinerea*, combined to the ability to enhance tomato seedling growth. The capacity of selected strains in reducing postharvest infection of *B. cinerea* on tomato fruit was also studied along with the identification of their emitted VOCs by SPME-GC/MS and characterizing the antifungal activity of interesting volatiles.

## 2. Material and methods

### 2.1. Biological material

#### 2.1.1. Bacterial strains

Bacterial strains were isolated from flower, fruit, leaf, petiole, root and stem of healthy tomato plants sampled in six localities in Cap Bon

region in Tunisia (Fig. 1; Supplementary Table 1). Tomato organs were surface-disinfected with 3 % sodium hypochlorite solution for 6 min and 70 % ethanol for 1 min and washed 5 times with sterile distilled water. The disinfection efficiency was verified by pouring the water of the last wash on Luria Bertani (LB) agar medium. Each sample was aseptically cut into small pieces and deposited on LB agar medium. Petri dishes were incubated for 2 d at 30 °C in obscurity, and then growing bacterial colonies were streaked onto new LB agar plates. The obtained bacterial cultures were stored at -20 °C in LB broth medium containing 25 % of glycerol. Bacterial isolation was balanced for each plant organ and collection site.

#### 2.1.2. Fungal strains

Two fungal strains S2 and S5 of *Botrytis* sp. were isolated on Potato Dextrose Agar (PDA) medium from tomato fruit collected in the locality of Teboulba in the Sahel region in Tunisia. The fungal strains were molecularly characterized by sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of the ribosomal RNA using ITS4 (5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3') and ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAA-CAAGG-3') primers (White et al., 1990). The nucleotide sequences were assembled using the CAP program available on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Blast sequences in the NCBI data bank showed that they belong to the *Botrytis cinerea* species. The sequences were deposited in GenBank with accession numbers MK854558.1 and MK854559.1, respectively. The 18S rDNA type material sequences of different *Botrytis* species and out groups *Saccharomyces cerevisiae* culture CBS:1201, *Aspergillus niger* ATCC 16888, *Beauveria bassiana* isolate CIDDB38, *Fusarium sambucinum* strain 166A, *Parastagonospora nodorum* were aligned using the Bioedit software. Neighbor joining tree showing the phylogenetic relationships among the fungal strains, based on 18S rDNA sequences and the out groups, was constructed (Supplementary Fig. 1). Bootstrap values of > 50 % from a sample of 1000 replicates were considered. The construction of phylogenetic tree in R was done using ape (Paradis and Schliep, 2019) and phangron (Schliep, 2011; Schliep et al., 2017) packages for phylogenetic study.

#### 2.1.3. Plant material

Organic tomato seeds of the variety RioGrande were used for the germination tests. The cherry tomato fruit used in the *in vivo* protection assay were purchased from the market.

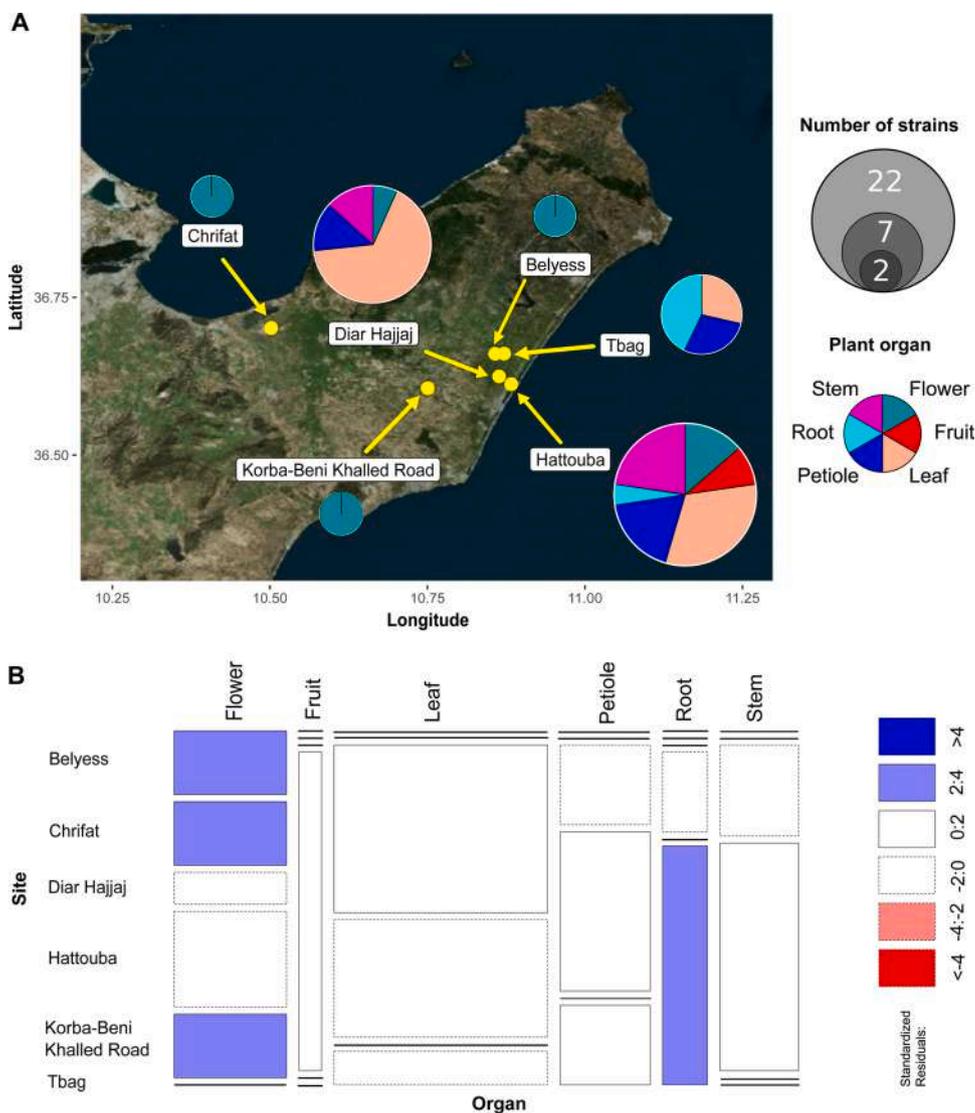
## 2.2. Antifungal activity tests

### 2.2.1. Test of volatile organic compounds

The antifungal activity of bacterial VOCs was assessed by the double Petri dishes method (Rouissi et al., 2013). A 7 mm diameter disc of the 7 d old fungal culture (in dark at 25 °C) was transplanted on PDA medium 24 h before the dual confrontation with the bacterial culture. A 100 µL of bacterial suspension (24 h liquid LB bacterial culture at 30 °C) and adjusted to 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> was poured on LB agar medium. The two plates were overlaid and sealed with cellophane paper to prevent the loss of bacterial VOCs. In the control plates the fungal cultures were placed in front of an LB agar plate. The fungal growth was monitored at 7, 14 and 21 d of confrontation and the antagonistic activity of bacterial strains against the fungal strains was evaluated by calculating the Area Under Growth-Progress Curve (AUGPC).

### 2.2.2. Test of soluble compounds

This test was performed for 5 selected bacteria strains against *B. cinerea* strains S2 and S5. The bacterial strain was streaked at the middle of a Petri dish containing PDA medium and two mycelia disks (5 mm diameter) of 7 d old *B. cinerea* cultures were placed in both sides at approximately 2 cm from the bacteria culture line. Plates were incubated at 25 °C in dark for 7 d and the antagonistic activity was evaluated by measuring the diameter of the fungal colony. The test was repeated



**Fig. 1.** Collection of endophytic bacterial strains from different organs of healthy tomato plants. (A) Localisation of collecting sites in the Cape Bon region in Tunisia. For each site, the pie chart represents the relative proportion of bacterial strains isolated from the different plant organs. The size of the pie chart is proportional to the number of isolated bacterial strains. (B) Mosaic plot showing statistical enrichment of the bacterial endophytic collection according to site of prospection and plant organ. Standardized residuals are mapped to colors and percent values to surfaces. Marginal counts of each level of site and organ variables are indicated into brackets.

**Table 1**

Type III analysis of variance of *Botrytis cinerea* mycelia growth under the influence endophytic bacterial volatile organic compounds.

Source of variation	df	7 d		14 d		21 d		AUGPC	
		F value	Pr(>F)						
Bacteria strain	50	6.8940	9.417e-15 ***	6.9942	4.022e-15 ***	4.4705	6.308e-09 ***	7.4125	5.675e-16 ***
Botrytis strain	1	1.2470	0.2655	11.6370	0.0007872 ***	11.6780	0.0007727 ***	7.8017	0.005745 **
Bacteria strain * Botrytis strain	50	3.0742	1.631e-08 ***	3.8637	8.072e-12 ***	3.7161	3.647e-11 ***	4.2633	1.909e-13 ***

The analysis was performed based on fungal growth kinetics (at 7, 14 and 21 d of co-culture with endophytic bacteria) and area under growth progress curve (AUGPC). Data were analyzed with a mixed linear model where endophytic bacteria, *Botrytis* strain and their interaction were considered as fixed effects. Independent experiment was treated as a random effect. AUGPC: Area Under Growth Progress Curve. Significance codes for *p*-values: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 . 1.

twice with three Petri dishes for each bacterial-fungal strains combination. Control Petri dishes contained only two mycelia disks of the fungal strains.

**2.3. Plant growth promoting (PGP) tests**

Tomato seeds were disinfected with 3 % sodium hypochlorite solution for 6 min and 70 % ethanol for 1 min, and then washed 5 times with sterile distilled water. The efficiency of seed disinfection was evaluated by pouring 100  $\mu$ L of the last wash water on LB agar medium. The bacterial strains were cultured in LB broth for 24 h at 30 °C in the dark in a shaking incubator at 150 rpm min<sup>-1</sup>. Each bacterial culture was

suspended in physiological saline solution (0.9 % NaCl) and adjusted to 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> using a densimeter (Biomérieux). The test was carried out in double compartment Petri dishes, in one compartment a sterile Wattman paper disc (6 mm diameter) inoculated with 50  $\mu$ L bacterial suspensions was placed on LB agar medium and in the second compartment 20 seeds were placed on 0.9 % Agar medium. Seed germination was monitored for 6 d of co-culture. At the end of the experiment, the length, the fresh and the dry weights of seedlings were measured.

## 2.4. *In vivo* protection assays

### 2.4.1. Fruit protection test by bacterial VOCs

Tomato fruit free from wounds with comparable sizes and stage of maturity were used in this work. The fruit were disinfected by soaking them in 3 % sodium hypochlorite for 30 min, and then rinsed several times with sterile distilled water. Then, a hole of 6 mm in diameter was performed in fruit skin and a fungal mycelia disc of 5 mm was placed in it. Fungal inoculated fruit were placed in plastic boxes in the presence of 24 h old bacterial culture on solid LB medium. Control fruit were inoculated by PDA discs. The boxes (contains two filter papers imbibed with sterile distilled water to maintain high humidity) were sealed with cellophane paper to prevent the release of bacterial VOCs and incubated in the dark at  $24 \pm 2$  °C. The degree of *B. cinerea* infection on fruit was estimated by measuring the diameter and the depth of the macerated zone due to fungal colonization of the tissues at 6 d after inoculation.

A split plot design was used in this assay; each plastic box contains all three different fungal treatments (non-infected fruit, fruit infected with either S2 or S5 *B. cinerea* strain) and one Petri dish with one antagonistic bacteria strain on solid LB medium or no bacteria for the control. The test was repeated three times, with two replicates per treatment.

### 2.4.2. Fruit protection test by bacterial vegetative cells

The same assay as described above was made except that tomato fruit were soaked in bacterial suspension of  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> for 30 min, then dried on autoclaved filter paper under laminar flow hood and placed in the boxes. A split plot design was used in this test and the experiment was repeated three times with two replicates per treatment. The degree of infection of *B. cinerea* on tomato fruit was estimated as described above.

## 2.5. Molecular characterization of bacteria strains

Genomic DNA of bacteria strains was extracted according to (Andreou, 2013) method with some modifications. The 16S rDNA gene sequence was amplified by PCR and sequenced using the primers fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3') and rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG C-3') (Weisburg et al., 1991). The nucleotide sequences were assembled, aligned with BioEdit software, and deposited in GenBank and the accession numbers obtained. The 16S rDNA sequences of the bacteria strains and the out groups *Streptomyces* sp. strain N2–8 and *Paenibacillus polymyxa* strain NBRC 15,309 were aligned using the Bioedit software. Neighbor joining tree showing the phylogenetic relationships among the bacterial strains based on 16S rDNA sequences was constructed (Supplementary Fig. 2). Bootstrap values of > 50 % from a sample of 1000 replicates were considered. The construction of phylogenetic tree in R was done using ape (Paradis and Schliep, 2019) and phangron (Schliep, 2011; Schliep et al., 2017) packages.

## 2.6. Biochemical characterization of bacteria strains

The biochemical characterization of selected bacteria strains was performed on the basis of their enzymatic activities, siderophores, hydrogen cyanide (HCN) and ammonia production and solubilisation of phosphate. The cellulose (Gupta et al., 2012), pectinase (Hankin et al., 1971), phytases (Kerovuo et al., 1998), xylanase (Khan et al., 1986), amylase (Vaseekaran et al., 2011), protease (Durham et al., 1987) and chitinase (Hsu and Lockwood, 1975) activities were tested on minimal media containing cellulose, pectine, myoinositol, xylan, starch, and casein and colloidal chitin, respectively. The production of enzymes was detected by the formation of a clear circular area around the bacteria colony. The production of siderophores was detected by sub-culturing bacteria on blue Agar CAS medium (Schwyn and Neilands, 1987). When siderophores are produced they remove iron from the dye complex and the color of the medium changes from blue to orange. The PVK medium was used to test the phosphate solubilisation by bacteria strains

(Pikovskaya, 1948). A clear circular area around the bacteria colony is formed if the bacterial strain has the ability to solubilize the phosphate. Ammonia was tested on peptone water by addition of the Nessler reagent (Cappuccino and Sherman, 2005). The change of the bacterial suspension from yellow to brown indicates the ammonia production. HCN production was measured on Wattman paper (soaked in 2.5 g L<sup>-1</sup> picric acid in 12.5 g L<sup>-1</sup> sodium carbonate) placed on the lid of the Petri plate. Bacterial streaks were made on LB agar medium amended with glycine (4.4 g L<sup>-1</sup>). The plates were then sealed with cellophane and incubated at 30 °C for 4 d. A color change of the filter paper from deep yellow to reddish-brown color was considered as an indication of HCN production (Bakker and Schippers, 1987).

## 2.7. Analysis of volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometer (SPME-GC–MS)

Headspace vials (20 mL) were filled with 6 mL of LB agar medium and autoclaved. The selected bacteria were inoculated in the prepared headspace vials and incubated at 30 °C in the dark for 7 and 14 d. Vials containing LB agar medium without bacteria were used as controls. The bacterial VOCs were collected using the SPME fiber (Carboxen/ DVB/ PDMS (2 cm) 50/30 µm) commercially available from Agilent Technologies (USA). The fiber was conditioned at 250 °C for 30 min in the hot injector of the GC and then exposed to the headspace of the culture vials for 1 h. Once the adsorption/absorption was complete, the fiber was desorbed in the injector in splitless mode (5 min) with a transfer line temperature of 260 °C. Gas chromatography analysis was carried out using an Agilent 19091S-433: 2169.66548 GC coupled to an HP-5MS 5 % Phenyl Methyl Silox with a DB Wax capillary column (325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm) and Helium as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature program was fixed at 40 °C for 5 min, followed by an increase by 20 °C min<sup>-1</sup> to 250 °C with holding for 15 min. Identification of the various compounds was performed by matching the recorded mass spectra with those stored in the Wiley 09 NIST 2011 mass spectral library of the GC–MS data system. The experiment was repeated twice with two replicates per strain per time of incubation.

## 2.8. Antifungal activity test of pure volatile compound

The activity of the pure volatile compound 3-Methylbutan-1-ol (isoamyl alcohol) (Merck) was tested *in vitro* against *B. cinerea* growth and infection on tomato fruit. The *in vitro* antifungal activity test was done as described in Section 2.1 with different concentrations of 3-Methylbutan-1-ol instead of the bacteria strains. The *B. cinerea* culture of S2 and S5 strains was facing 13 mm diameter Whatman paper disc impregnated with different concentrations of 3-Methylbutan-1-ol ranging from 0.004 to 0.885 mL L<sup>-1</sup> headspace. The plates were immediately sealed with cellophane and incubated for 5 d at 25 °C in the dark. Plates with a non impregnated filter paper were used as control. The half maximal inhibitory concentration (IC50) and the maximal inhibitory concentration (IC100) of 3-Methylbutan-1-ol on *B. cinerea* mycelium growth were determined with the regression equation using the Probit method. Three plates per fungal strain and compound concentration were used and the experiment was repeated two times.

The antifungal tests of the 3-Methylbutan-1-ol against *B. cinerea* infection on tomato fruit was performed as described in Section 2.4.1 with this volatile compound instead of the bacteria strains. The 3-Methylbutan-1-ol was impregnated in a 90 mm diameter filter paper in the center of the box with the concentrations corresponding to IC50 and IC100. Cherry tomato fruits were inoculated with 6 mm diameter of *B. cinerea* strains S2 and S5 and incubated at  $24 \pm 2$  °C in the dark. The fungal infection was evaluated as described in Section 2.4.1 at 6 d post infection. A split plot design was used, with each box contains all three fungal treatments *i.e.* non-infected fruit and fruit infected with S2 or S5 strain in presence or not (control) of 3-Methylbutan-1-ol. The test was

repeated two times, with 1 box for each volatile concentration and 3 fruits for each treatment.

2.9. Statistical analysis

Mixed Linear Models were implemented for analyses of variance using lme4 and lmerTest R packages. Multiple mean comparisons were performed using Dunnett (comparisons to control) or Tukey (pairwise comparisons) tests at  $p\text{-value} \leq 0.05$ . All statistical analyses were performed using R x 64 3.5.1 software.

3. Results

3.1. Characterization of the endophytic bacteria collection

Fifty endophytic bacteria strains were isolated from aerial and root organs of healthy tomato plants harvested in six field sites of Cape Bon region in Tunisia (Fig. 1A). Morphologically, 75 % of the strains form large confluent white colonies, with the remaining strains forming small, isolated colonies. All isolated strains are characterized by a rapid growth (< 24 h). The distribution of the bacterial strains according to the site of prospection and organ of isolation is represented in Fig. 1. The collection is significantly enriched with bacteria from leaves which represent 38 % of all isolated strains (\*\* $P < 0.001$ ). A total of 22 strains were isolated from Hattouba locality showing the most abundant and

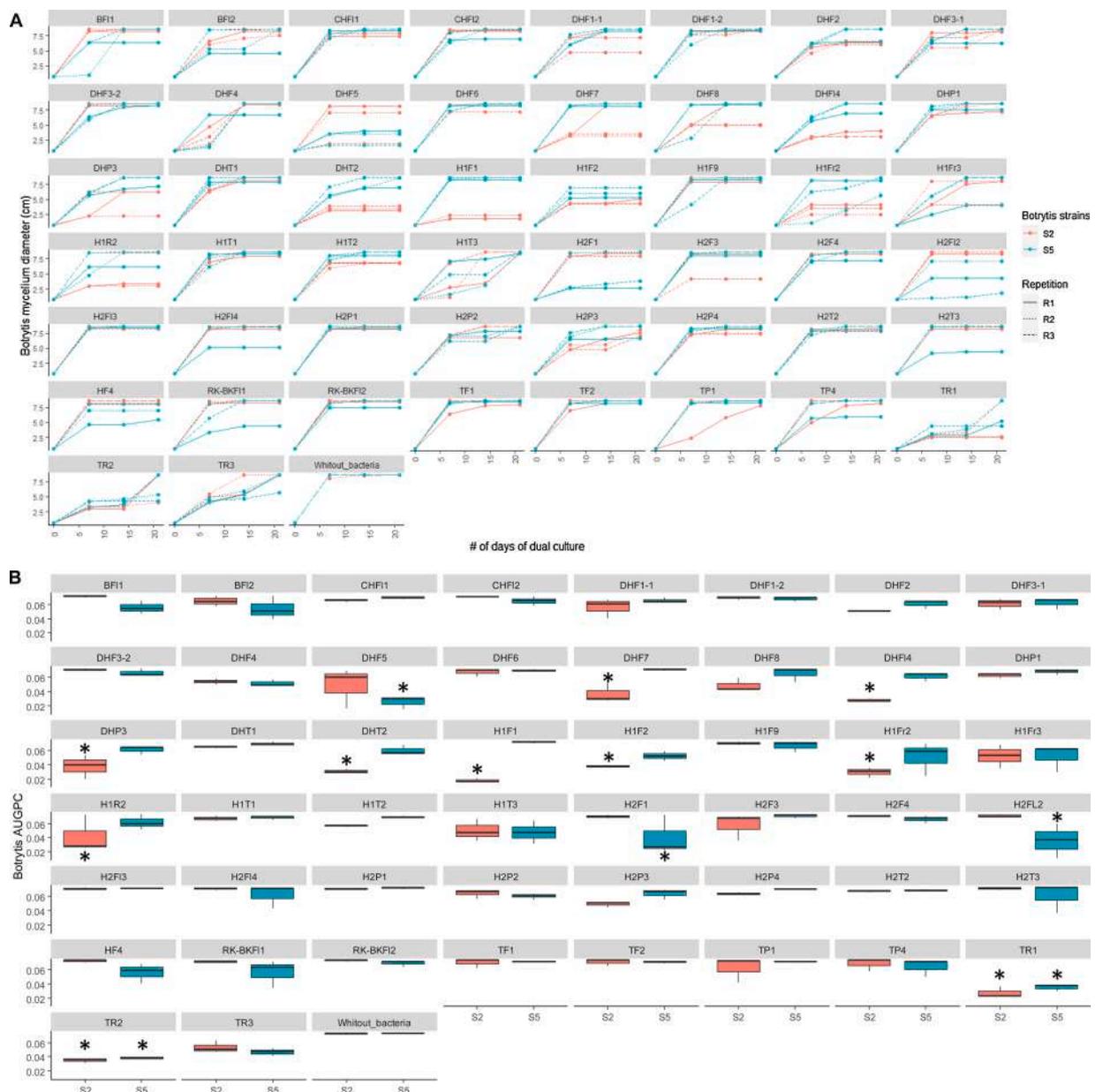


Fig. 2. (a) Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of endophytic bacterial volatile organic compounds (VOCs). (A) Radial mycelia growth kinetics of *Botrytis cinerea* strains S2 and S5 subjected to bacterial VOCs in dual culture assay. Three independent replicates were performed for each bacterium-fungus strains combination. (b) Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of endophytic bacterial volatile organic compounds (VOCs). (B) Area under growth progress curve (AUGPC) of *Botrytis cinerea* strains S2 and S5 subjected to bacterial VOCs in dual culture assay. For AUGPC a low value indicates a high antifungal activity of bacteria strains. Three independent replicates were performed for each bacterium-fungus strains combination. Asterisks indicate a difference in comparison to treatment "Without-Bacteria" as revealed by Dunnett's test ( $*P < 0.05$ ).

diverse set of strains regarding the organ of origin. The strains isolated from Tbag locality are statistically enriched in bacteria recovered from roots (Fig. 1B). Endophytic bacteria collections from Belyess, Chirfat and Korba-BeniKhalled road are the least abundant with only two strains isolated from flowers each. This shows a broad range in the abundance of bacterial endophytic communities and in their distribution within plant according to the site of prospection, even at a small geographically scale.

### 3.2. Antifungal activity of bacterial volatile organic compounds

The antifungal activity tests of VOCs produced by the bacteria strains against two strains of *B. cinerea* showed that the reaction varies with the bacteria and fungi strains and the time of observation (Fig. 2). Indeed, the ANOVA on basis of data of the kinetics of growth (at 7, 14 and 21 d of co-culture with the bacteria strains) and the Area Under Growth-Progress Curve (AUGPC) showed a significant effect of the bacteria strain, the fungal strain and their interaction (Table 1). Eighteen bacteria strains (i.e. 36 % of the collection) showed sustainable or temporary antagonistic effect against *B. cinerea* (Table 2). These antagonistic bacteria were isolated from the localities of Diar Hajjaj, Hattouba and Tbag. Three antagonistic behaviors were noted (i) eight strains (i.e. 62 % of the antagonistic bacterial strains) specifically inhibited *B. cinerea* S2 strain, with DHT2, H1Fr2, DHF14 and H1F1 strains showing the strongest antagonistic effects; (ii) three strains, namely DHF5, H2F12 and H2F1, specifically reduced the mycelia growth of S5 strain of *B. cinerea*; (iii) two strains, namely TR1 and TR2, significantly inhibited the mycelia growth of both fungal strains. After 21 d of co-culture, mycelia growth was respectively reduced up to 76.7 % for S2 strain due to bacterial VOCs produced by H1F1 strain and 64.5 % for S5 strain due to DHF5 VOCs.

The antagonistic bacterial strains were also selected according to the

persistence of their activity during 21 d of dual confrontation (Table 1). Twelve strains maintained a significant antagonistic activity against *Botrytis* mycelia growth up to 21 d of co-culture, with nine and three strains against S2 and S5 *Botrytis* strains respectively (Table 2). Five strains were characterized by temporary antifungal activity that decline after 7 d of co-culture (e.g. TR3, BF11 and H1Fr3 against S5 or H1T3 and DHF4 against both S2 and S5 strains). Some strains had intermediate persistent effect. For example, the antagonistic activity of TR2 strain against the two *Botrytis* strains declined after 14 d. While the TR1 strain activity against S5 *Botrytis* strain declined after 14 d it was maintained against S2 *Botrytis* strain till 21 d of confrontation.

The molecular identification using 16S rRNA gene sequences of the 18 antagonistic endophytic bacteria strains (accession numbers from MN080812.1 to MN080816.1 and from MN737985.1 to MN737997.1) showed a statistically enrichment in bacteria of *Bacillus* genus (Supplementary Table 2, Monte Carlo simulated  $\text{Khi}^2$  \*\*P < 0.01). Indeed, 16 strains (i.e. 89 %) belong to nine *Bacillus* species including five strains from *B. velezensis* (no statistically significant enrichment). The remaining two strains belong to different species of the *Enterobacter* genus. No statistical association between the endophytic bacterial species and their antifungal effect on S2 or S5 *B. cinerea* strains was observed according to  $\text{Khi}^2$  independence test. This suggests that no endophytic bacterial species specifically protects against a specific strain of *Botrytis cinerea*. Likewise, no significant enrichment of the site or organ of origin with antagonistic bacteria strains was observed.

### 3.3. Effect of bacterial volatile organic compounds on tomato seed germination and seedling growth

The endophytic bacteria strains were screened *in vitro* towards their VOCs activity on tomato seed germination and seedling growth. The studied parameters relative to seed germination and seedling growth (i.

**Table 2**

Kinetic and persistence of antifungal activity of endophytic bacterial volatile organic compounds (VOCs) against *Botrytis cinerea* strains S2 and S5. (For interpretation of the references to colour in this table, the reader is referred to the web version of this article).

Strain ID	Bacteria species	Antifungal activity against S2 strain				Antifungal activity against S5 strain			
		AUGPC	7 d	14 d	21 d	AUGPC	7 d	14 d	21 d
<b>H1F1</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	White	White	White
DHF14	<i>Enterobacter asburiae</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	White	White	White
H1Fr2	<i>Bacillus vallismortis</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	Light Blue	White	White
<b>DHT2</b>	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	White	White	White
DHF7	<i>Bacillus subtilis subsp.spizezenii</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	White	White	White
H1F2	<i>Bacillus velezensis</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	White	White	White
DHP3	<i>Bacillus subtilis</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	White	White	White
H1R2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	White	White	White
DHF5	<i>Bacillus toyonensis</i>	White	White	White	White	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
<b>H2F12</b>	<i>Bacillus velezensis</i>	White	White	White	White	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
H2F1	<i>Bacillus proteolyticus</i>	White	White	White	White	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
<b>TR1</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
TR2	<i>Bacillus nakamurai</i>	Dark Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
H1T3	<i>Bacillus velezensis</i>	White	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
TR3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	White	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
DHF4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	White	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
BF11	<i>Bacillus velezensis</i>	White	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
H1Fr3	<i>Bacillus velezensis</i>	White	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue

Only endophytic bacteria strains producing antifungal VOCs are presented here. Dark Orange and dark blue colors in AUGPC (Area Under Growth Progress Curve) and fungal mycelia growth kinetic at 7, 14 and 21 d indicate significant differences in comparison to the control 'without bacteria' using Dunnett test at  $p\text{-value} \leq 0.05$  using adjusted means from mixed linear models. Light orange and light blue colors indicate sub-significant differences using Dunnett test at  $p\text{-value} \leq 0.1$ . White color indicates the absence of significant antifungal activity in comparison to the control 'without bacteria'. Bacterial species were identified on the basis of 16S rRNA gene sequences and homology search in Genbank database. Bacteria strains in bold were selected on the basis of their high and persistent VOCs antifungal activities against one or both *B. cinerea* strains.

e. length and fresh and dry weights) were significantly affected by bacterial VOCs after 6 d of dual culture (\* $P < 0.05$ , Tables 3 and 4). Three different behaviors were observed depending on the bacteria strain and the measured parameter. According to the measured parameter, between 66 % and 94 % of bacteria strains produced VOCs with neutral effect on plant development, i.e. seed germination or seedling growth (Fig. 3). A promoting behavior of VOCs was noted for 2 % to 8 % of bacteria strains depending on the measured parameter; indeed four strains (RK-BK F11, DHF14, H2F3 and H1F9) enhanced seedling fresh weight, two strains (DHF6 and H2F13) enhanced seedling length, and one strain (H2T2) enhanced seedling dry weight in comparison to control seeds in presence of the LB medium (Fig. 3). However, no bacteria strain showed positive effect on seed germination rate (Fig. 3). Some bacteria strains showed deleterious effect on plant development depending also on the measured parameter, 22 % reduced seed germination, 26 % reduced seedling fresh weight, 6 % reduced seedling length and 4 % reduced seedling dry weight (Fig. 3). The effect of bacterial VOCs depends on the measured parameter. For example DHF6 and H2F13 increase seedling length but not seedling fresh and dry weights. Some bacterial VOCs enhanced seedling growth but have no effect (e.g. DHF6, H1F9 or H2T2) or even inhibited seed germination (e.g. H2F13) (Fig. 3). Finally, some bacteria strains such as H2F1 produced VOCs that inhibit seed germination and seedling growth (Fig. 3).

#### 3.4. Correlation between antifungal and plant growth activities of bacterial volatile organic compounds and clustering of strains

Among the 16 possible correlations between the measured parameters related to VOCs antifungal and plant growth activities, three were statistically significant (Fig. 4A). A significant positive correlation was observed between fresh and dry weights of tomato seedlings and between germination and seedling fresh weight. A significant and positive correlation was observed between the antifungal activities against the two *Botrytis* strains S2 and S5. No significant correlations were observed between the parameters related to antifungal and plant growth activities of bacterial VOCs.

Clustering of the endophytic strains based on their VOCs antifungal and plant growth activities showed five bacteria clusters (Fig. 4B). The cluster I contains one bacteria strain, H2F13, with VOCs activity quite similar to LB medium without bacteria; the cluster II contains 4 strains with strong antifungal effect against S2 *B. cinerea* strain only whereas, the cluster III contains 18 strains with strong antifungal effect against S2 *B. cinerea* strain and weak (not significant) activity against S5 *B. cinerea* strain. The cluster IV contains 12 bacteria strains with VOCs effects against both *B. cinerea* strains. The cluster V contains 15 strains with specific antifungal activity against S5 strain of *B. cinerea*.

#### 3.5. Selection and characterization of endophytic bacteria strains with potential use for the control of *Botrytis cinerea*

##### 3.5.1. Selection of endophytic bacteria strains

On the basis of the clustering of endophytic bacteria, five strains belonging to the clusters II, III, IV and V of bacteria producing VOCs with strong antifungal activities and, as much as possible, having neutral to promoting effects on tomato seed germination and seedling growth were selected for further studies (Fig. 4B, Supplementary Table 2). The 16S

**Table 3**

Type III analysis of variance of seedling growth under the influence of endophytic bacterial volatile organic compounds.

Source of variation	df	Seedling length		Fresh weight		Dry weight	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Bacteria strain	50	5.2195	1.676e-09 ***	19.884	< 2.2e-16 ***	2.1235	0.006331 **

Data were analyzed with a mixed linear model where endophytic bacteria were considered as fixed effects and independent experiment was considered as a random effect. In order to normalize residuals of MLM, log<sub>10</sub> (Fresh weight) and log<sub>10</sub> (Dry weight) transformations were used. Significance codes for *p*-values: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 ' 1.

**Table 4**

Type III analysis of variance of tomato seed germination under the influence of endophytic bacterial volatile organic compounds.

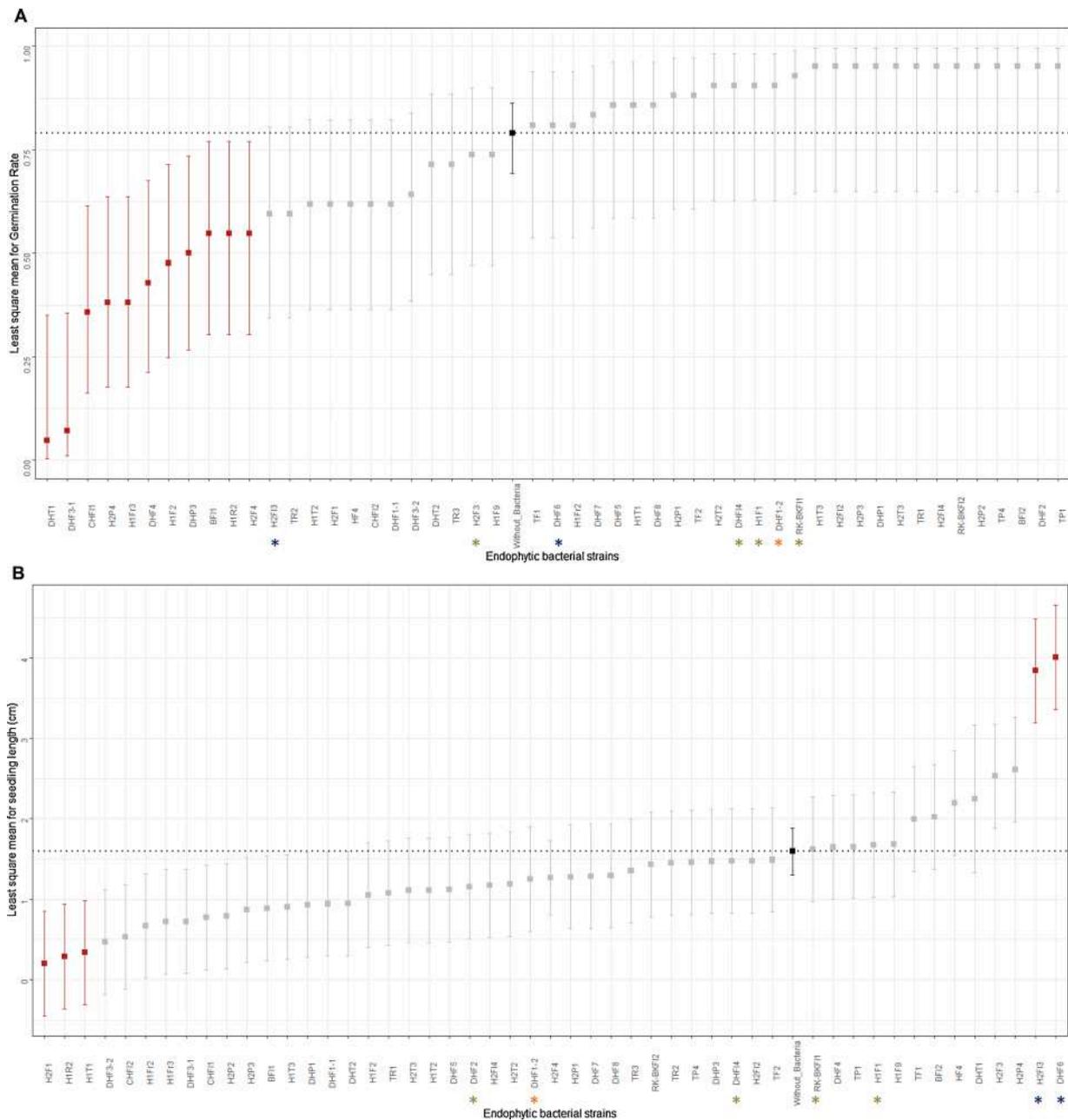
Source of variation	df	Germination rate	
		LRT	Pr(Chi)
Bacteria strain	50	324.44	< 2.2e-16 ***

Data were analyzed with a generalized linear mixed model where endophytic bacteria were treated as fixed effects and independent experiment considered as random effect. LRT (Likelihood Ratio Test) and *p*-value comparing the model with or without fixed factor are reported. Significance codes for *p*-values: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 ' 1.

rRNA gene sequencing of selected endophytic bacteria strains showed that they belong to the following species: *Bacillus amyloliquefaciens* H1F1 (Cluster II), *Bacillus pseudomycooides* DHT2 (Cluster III), *Enterobacter cloacae* TR1 (Cluster IV) and *Bacillus velezensis* H2F12 and BF11 (Cluster V) (Table 2).

##### 3.5.2. Identification of volatile organic compounds produced by selected endophytic bacteria strains

The volatile organic compounds produced by the five endophytic bacteria strains along with the control LB Agar medium were characterized and measured by SPME-GC/MS at 7 and 14 d (Supplementary Table 4). The overall comparison of the VOCs profiles of endophytic bacteria showed a clear difference between them and according to the time of culture for the same strain (Fig. 5). A total of 93 volatile organic compounds were detected with 68 compounds (i.e. 73 %) of known identity (Supplementary Table 4). Twenty VOCs were produced by all five strains, including seven compounds which were not detected in the free bacteria LB Agar medium: six identified compounds (1-Octyn-3-ol,4-ethyl ;  $\beta$ -Fenchol; Benzene,m-di-tert-butyl; 2-Undecanone; 3,3,5-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-2,8-dione; 2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl) and one unidentified compound (NI). These molecules may constitute a core set of VOCs produced by all tomato bacteria endophytes, whatever the bacteria species. Forty-four strain-specific VOCs (i.e. 47.31 %) were recorded, with a large majority (37/46 i.e. 80.4 %) produced at a specific culture time at 7 or 14 d. The two *B. velezensis* strains BF11 and H2F12 from the Cluster V which specifically reduced the mycelia growth of S5 strain of *B. cinerea* showed the most similar patterns of VOCs (Fig. 5) with Undecane,3-methyl as a common and specific volatile for both strains. BF11 produced in total 31 VOCs with six strain-specific compounds with Benzenamine, N-ethyl as a specific compound representing 0.74 % of its total produced VOCs (Supplementary Table 3). The strain H2F12 produced in total 36 VOCs among which seven are strain-specific with Dodecanal as the major compound representing 4.61 % and 5.54 % of all produced compounds at 7 and 14 d of culture, respectively. The strain DHT2 produced in total 43 VOCs among which 10 are strain-specific with Dimethyl disulfide as the major compound representing 37.19 % of its total produced VOCs. H1F1 strain produced in total 32 VOCs with three are strain-specific compounds with an unknown major compound representing 8.35 % of its VOCs (Supplementary Table 3). The strain TR1 showed the most distinct VOCs profile in comparison to the other bacteria strains (Fig. 5). Indeed, this strain produced in total 53 compounds among which 18 are strain-specific (i.e. 33.96 % of the detected VOCs) with Isoamyl Alcohol (3-



**Fig. 3.** Evaluation of *in vitro* effect of bacterial volatile organic compounds (VOCs) on tomato seed germination and seedlings growth at 6 d of dual culture. The values for the measured parameters represent the least square means and their standard deviations calculated from GLM for germination rate (A) and MLM for seedling length (B) and fresh (C) and dry weights (D). Red color indicates significant differences in comparison to the treatment “Without-Bacteria” as revealed by Dunnett’s test (\* $P < 0.05$ ). Dash horizontal line represents the least square mean value of the treatment “Without-Bacteria” which is plotted in black on the graphs. Blue, green and orange asterisks represent respectively bacterial strains with significant promoting effects on seedling length and fresh and dry weights.

Methylbutan-1-ol) is the major compound representing 80.91 % and 58.80 % of its produced VOCs at 7 and 14 d of culture, respectively (Supplementary Table 3).

**3.5.3. Soluble antifungal compounds, enzymatic and nutrient uptake activities of selected endophytic bacteria strains**

The capacity of selected bacteria strains to produce soluble antifungal compounds was evaluated by dual culture of both microorganisms on the same medium (Fig. 6). Except DHT2 strain, the selected bacteria strains significantly inhibited at different extent *B. cinerea* growth on PDA medium at 7 d of co-culture (Fig. 6, Tukey test \*\* $P < 0.01$ ). No significant effect of interaction between the bacteria and fungi

strains was observed (Table 5). The H1F1 strain produced the most effective antifungal soluble compounds against *B. cinerea*, followed by BF11 and H2F12 and TR1 strains (Fig. 6).

The antimicrobial (i.e. hydrolytic enzymes and HCN) and plant growth promoting (phosphate solubilization, siderophores and ammonia production) activities of the selected antagonistic bacteria were studied *in vitro* using appropriate media. Overall, the results showed that, at the exception of the TR1 strain (which only produced 1 out of 7 hydrolytic enzymes), the remaining four endophytic bacteria strains produced most of the studied enzymes (6 out of 7 hydrolytic enzymes) and have at least 2 out of 3 PGP activities (Supplementary Table 4). All the selected endophytic bacteria strains did not produce

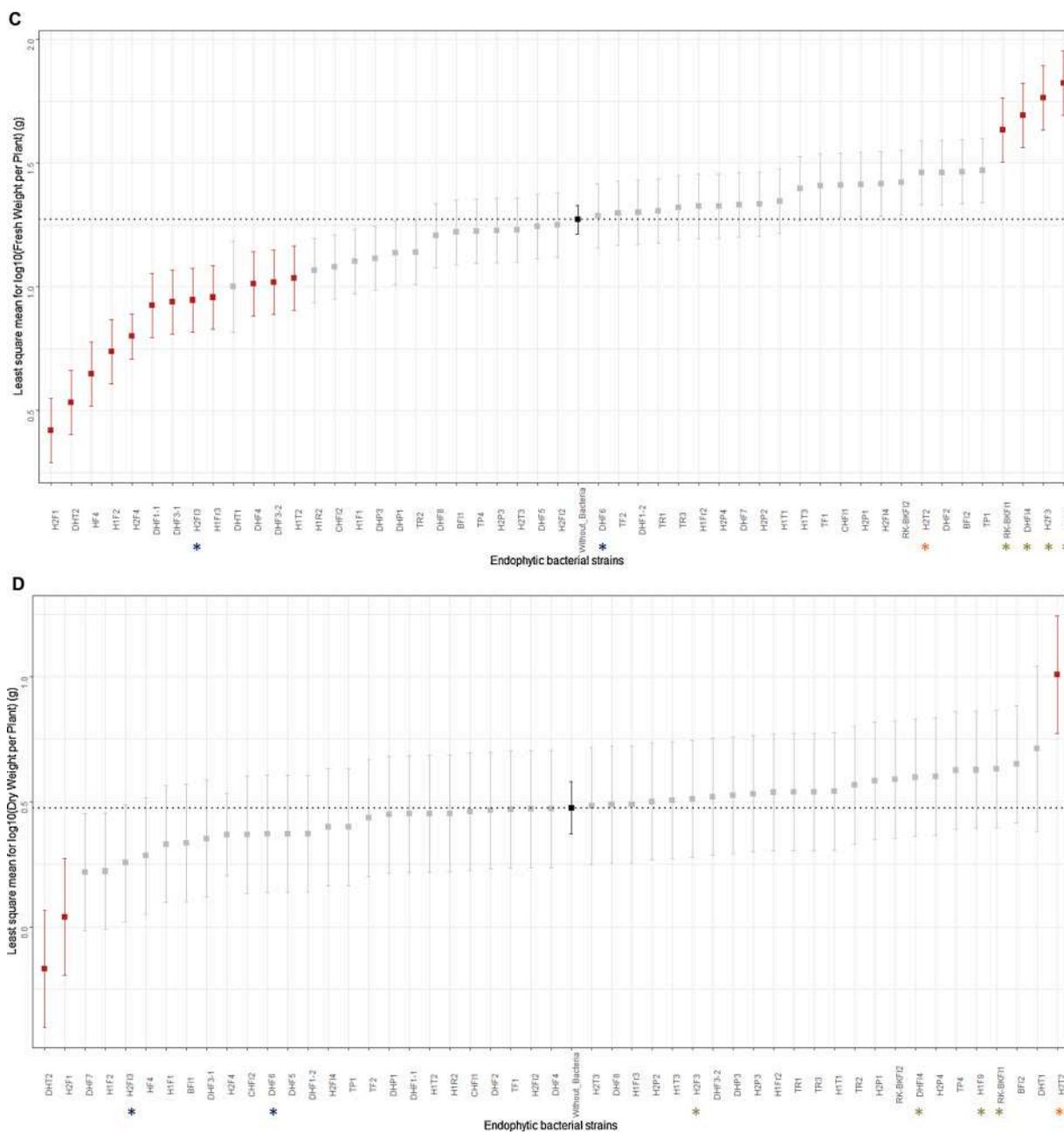


Fig. 3. (continued).

HCN (Supplementary Table 4).

### 3.6. In vivo biocontrol assay of *B. cinerea* on tomato fruit

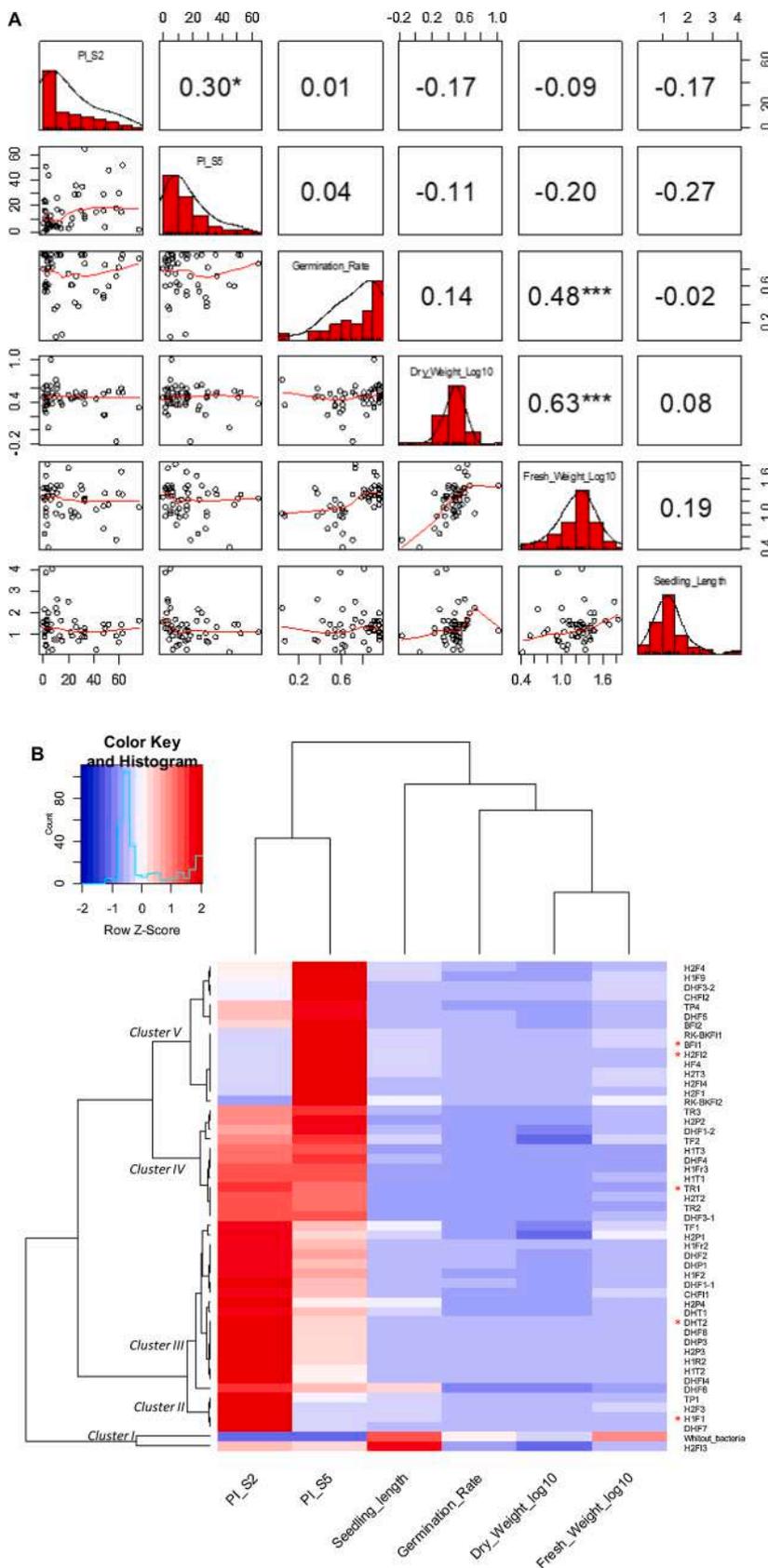
The evaluation of the bio-protection capacity of the selected endophytic bacteria strains against *B. cinerea* on tomato fruit was done by two tests using VOCs and vegetative bacterial cells. The results showed difference in the protection effectiveness of bacteria strains depending on the protection method used. The analysis of variance of the data of the bio-protection assay using bacterial VOCs, showed a sub-significant effect of the bacteria strains on the diameter ( $P < 0.1$ ) but not on the depth of *B. cinerea* rotting at 6 d after infection independently from the fungal strain (Table 6). Only the VOCs of TR1 strain reduced significantly the diameter of *B. cinerea* rotting on tomato fruit infected by both fungal strains S2 and S5 (Fig. 7).

The analysis of variance of the data of the bio-protection test using bacterial cells revealed a significant interaction between the bacteria

and the fungal strains on both infection parameters (i.e. diameter and depth of rotting) at 6 d after *B. cinerea* infection (Table 7). In general, the bacteria strains had the major effect on the depth in comparison to the diameter of rotting, with BF11 strain showing the strongest bio-protective effect against both fungal strains (Fig. 8). All the studied bacteria strains reduced the depth of rotting due to *B. cinerea* S2 strain infection on tomato fruit (Fig. 8C). Except TR1 strain, the used bacteria strains significantly reduced the depth of rotting due to *B. cinerea* S5 strain infection on tomato fruit, but at a less extent than that observed for S2 strain (Fig. 8). The endophytic bacteria strains H1F1 and DHT2 also reduced the diameter of *B. cinerea* S5 strain rotting on tomato fruit in comparison to mock-infected fruit without bacteria (Fig. 8B).

### 3.7. Antifungal activity of the pure volatile compound 3-Methylbutan-1-ol

The analysis of variance of *B. cinerea* mycelia growth in presence of 3-Methylbutan-1-ol at 5 d of exposition depends from the fungal strain,



**Fig. 4. (A) Correlation of the *in vitro* antifungal and plant growth activities of volatile organic compounds (VOCs) produced by 50 endophytic bacteria strains.** Pairwise correlations were computed based on lsmeans from MLM and GLMM analysis. For each endophytic strain, the percentage of inhibition of *Botrytis cinerea* mycelia growth of S2 strain (PI\_S2) and S5 strain (PI\_S5) was calculated based on AUGPC lsmeans values reported to value of the treatment “without bacteria”. Coefficients of pairwise Pearson correlation are indicated. Asterisks represent significant correlations according to following significance code for *p*-values: 0 ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*\*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘.’ 1. The graph was obtained using the pairs panels function of the psych package of R software. **(B) Heat map of the *in vitro* antifungal and plant growth activities of volatile organic compounds (VOCs) produced by 50 endophytic bacteria strains.** The hierarchical clustering for bacterial strains based on antifungal and plant growth activities was computed based on Pearson correlations and complete linkage. Z-scores were calculated and used to generate heat maps. Red color indicates high activity and blue colour indicates low activity. Dendrogram on the left shows bacteria strains clustering according to both anti-fungal and plant growth promoting biological activities and the five bacterial clusters (I to V). Red asterisks indicate the five endophytic bacteria strains which were selected for further analysis. The graph was obtained using the heatmap.2 function of the gplot package of R software.

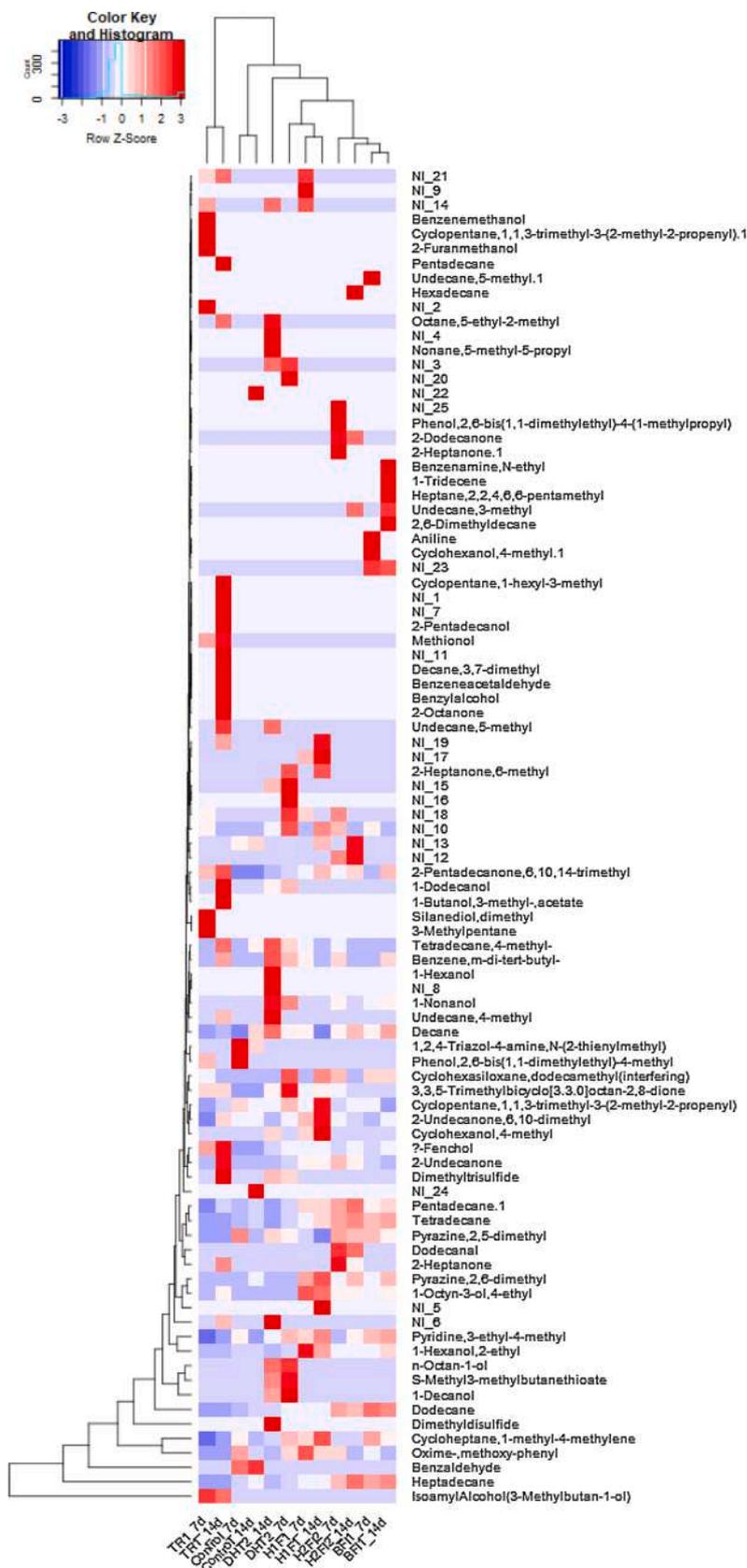
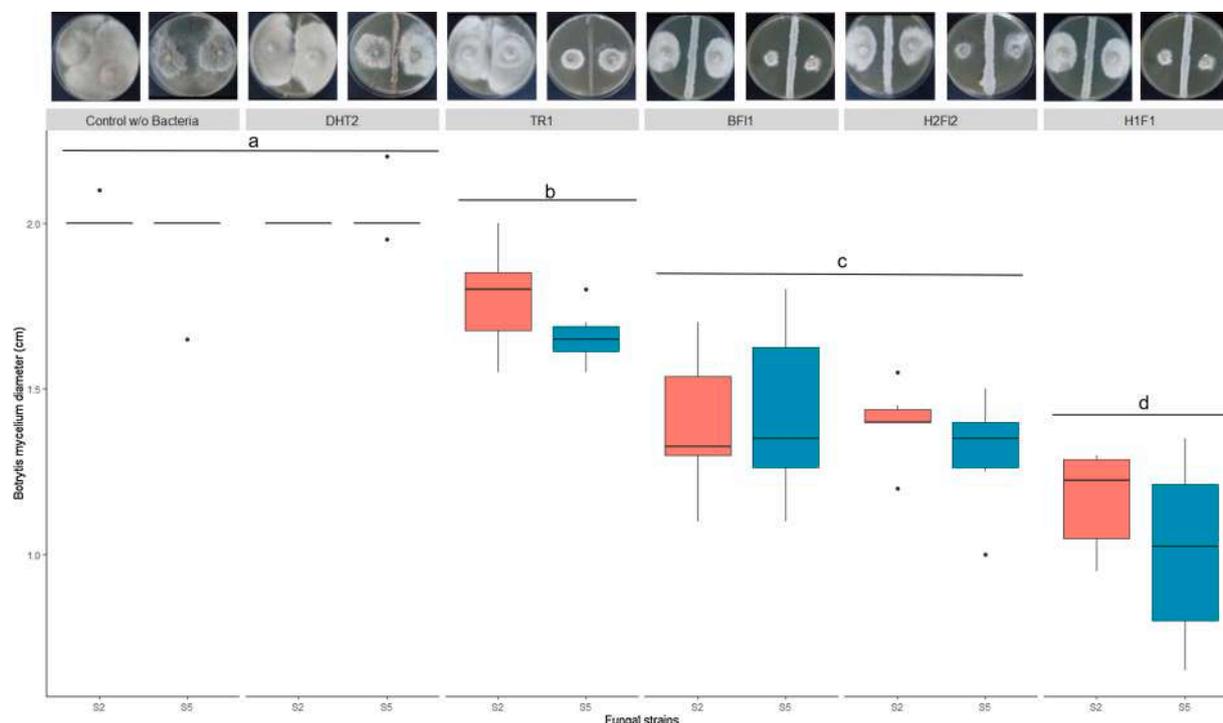


Fig. 5. Patterns of production of volatile organic compounds (VOCs) of five endophytic bacteria strains (BF11, DHT2, H1F1, H2F12 and TR1) detected by SPME-GC/MS technique. VOCs were measured at 7 and 14 d of bacterial culture on LB Agar medium (bacteria-free LB medium was used as a control condition) in two independent replicates. Means of molecules percentages for the two replicates were used to calculate Z-scores to generate heatmap. Data matrix was normalized by row to absorb the variation between VOC molecules. Dendrogram on the left shows the relationships between quantities of 92 emitted VOCs according to different samples (Bacterial strains and age of culture). Dendrogram on the upper part shows the relationships between samples according to their patterns of VOCs production. Blue colour indicates high concentration and pink color indicates low concentration of VOC. NI #: Non identified compound.



**Fig. 6.** *In vitro* antifungal activity through soluble compounds of five bacteria strains (BF11, DHT2, H1F1, H2F12 and TR1) against two *Botrytis cinerea* strains S2 and S5. The antifungal activity was assessed as the decrease in fungal mycelia growth compared to the control condition ‘Without bacteria’ on PDA medium at 7 d of co-culture. A representative plate at 7 d of co-culture is shown for each bacterium-fungus strains combination. Two independent replicates with three plates for each combination of bacterial and fungal strains were carried out. Letters identify significantly different groups according to Tukey test for multiple mean comparisons at \*\*P < 0.01.

**Table 5**

Type III analysis of variance of *Botrytis cinerea* mycelia growth under the influence of endophytic bacterial soluble compounds at 7 d of co-culture.

Source of variation	df	Fungal growth	
		F value	Pr(>F)
Bacteria strain	5	60.2059	<2e-16 ***
Botrytis strain	1	2.6826	0.1067
Bacteria strain * Botrytis strain	5	0.6562	0.6580

Data were analyzed with a mixed linear model where endophytic bacteria and *B. cinerea* strains and their interaction were considered as fixed effects and independent experiment was treated as a random effect. Significance codes for *p*-values: 0 ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*\*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘.’ 1.

**Table 6**

Type III analysis of variance of *Botrytis cinerea* infection on tomato fruit under the influence of endophytic bacterial volatile organic compounds at 6 d post-infection.

Source of variation	df	Diameter of rotting		Depth of rotting	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Bacteria strain	5	3.7286	0.087486	1.4592	0.20479
Botrytis strain	1	14.5479	0.000183	1.7555	0.18670
Bacteria strain * Botrytis strain	5	0.5880	0.709189	1.0594	0.38416

A split plot design was used in this assay. The experiment was repeated three times with two blocks for each replicate. Data were analyzed with a mixed linear model where endophytic bacteria, *B. cinerea* strains (S2 and S5) and their interaction were considered as fixed effects, whereas the replicate, block and whole plot (Plastic box) were treated as random effects. The data of mock-inoculated fruits *i.e.* fruits inoculated with PDA medium instead of the *B. cinerea* culture were not included in the statistical analysis. Significance codes for *p*-values: 0 ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*\*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘.’ 1.

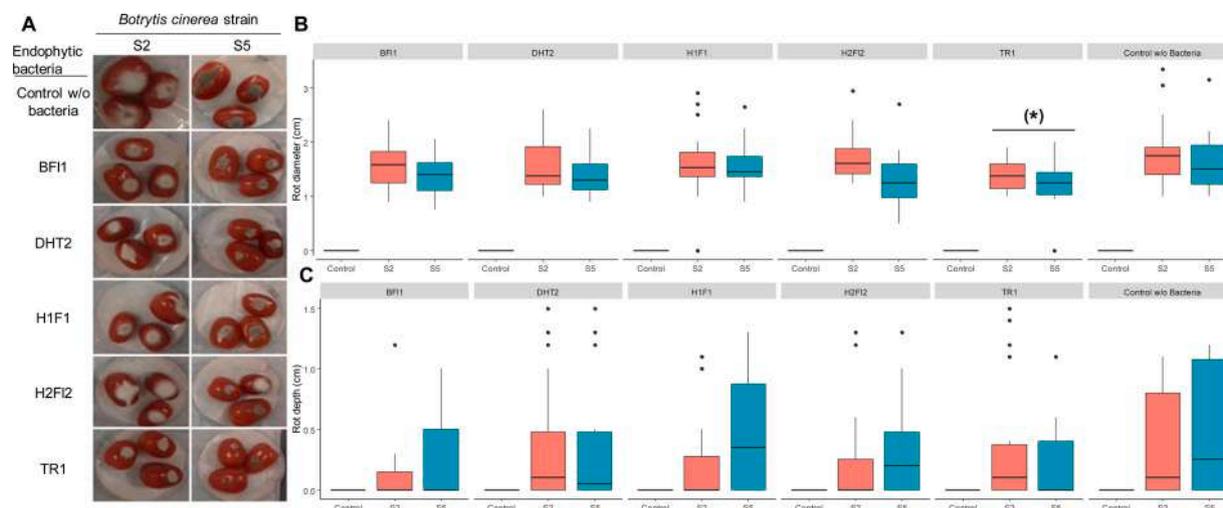
the concentration of this compound and their interaction (Table 8). The 3-Methylbutan-1-ol showed a significant antifungal activity against S2 strain since 0.177 mL L<sup>-1</sup> and against S5 since 0.221 mL L<sup>-1</sup> in comparison to the control (Fig. 9). The IC50 and IC100 of 3-Methylbutan-1-ol against both *B. cinerea* strains were about 0.221 mL L<sup>-1</sup> and 0.442 mL L<sup>-1</sup> headspace, respectively (Fig. 9).

The analysis of variance of *B. cinerea* rot diameter and depth on tomato fruit in presence of 3-Methylbutan-1-ol at 6 d post infection depends mainly from the concentration of this compound (Table 9). The 3-Methylbutan-1-ol decreased significantly *B. cinerea* rot diameter and depth for both fungal strains at IC50 and IC100 with a greater effect of the later concentration which totally suppressed fungal infection, but no visible phytotoxicity symptoms on tomato fruit were observed (Fig. 10A–C).

#### 4. Discussion

*Botrytis cinerea* is considered as one of the most important plant pathogens in term of the economic losses that engenders to agriculture sector worldwide (Dean et al., 2012; Jin and Wu, 2015). Synthetic fungicides are exclusively used to control this disease with a global cost exceeding 1 billion dollar (Hua et al., 2018) and causing negative impact on the environment and human health. Considering these constraints and the increasing awareness of consumers, the development of safe and eco-friendly management methods is needed for developing modern sustainable agriculture system. In this context, our work aims to select efficient endophytic bacteria strains to control *B. cinerea* infection on tomato fruit based on their VOCs antifungal activity and taking in account their effect on tomato seed germination and seedling growth, along with the identification of potential antifungal VOCs.

A total of 50 endophytic bacterial strains was isolated from aerial and root organs of healthy tomato plants in six localities in the Tunisian peninsula region of Cap Bon. Despite the short average distance between



**Fig. 7.** Effect of volatile organic compounds (VOCs) of five endophytic bacteria strains on *Botrytis cinerea* infection on tomato fruit. (A) Photos of tomato fruit exposed to endophytic bacterial VOCs or not (control without bacteria) at 6 d after infection with S2 or S5 *B. cinerea* strains. Boxplots represent the diameter (B) and the depth (C) of fruit rotting caused by S2 and S5 *B. cinerea* strains or mock condition (Control). Data were recorded from three independent experiments. Asterisk into brackets indicates significant difference in comparison to treatment “Without bacteria” as revealed by Dunnett’s test (\* $P < 0.05$ ).

**Table 7**

Type III Analysis of variance of *Botrytis cinerea* infection on tomato fruit after treatment with vegetative cells of endophytic bacteria at 6 d post-infection.

Source of variation	df	Diameter of rotting		Depth of rotting	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Bacteria strain	5	1.8734	0.25374	3.4324	0.1010336
Botrytis strain	1	370.3763	< 2e-16	13.1802	4.327e-06
Bacteria strain*	5	1.6731	0.08952	3.4896	0.0003036
Botrytis strain					***

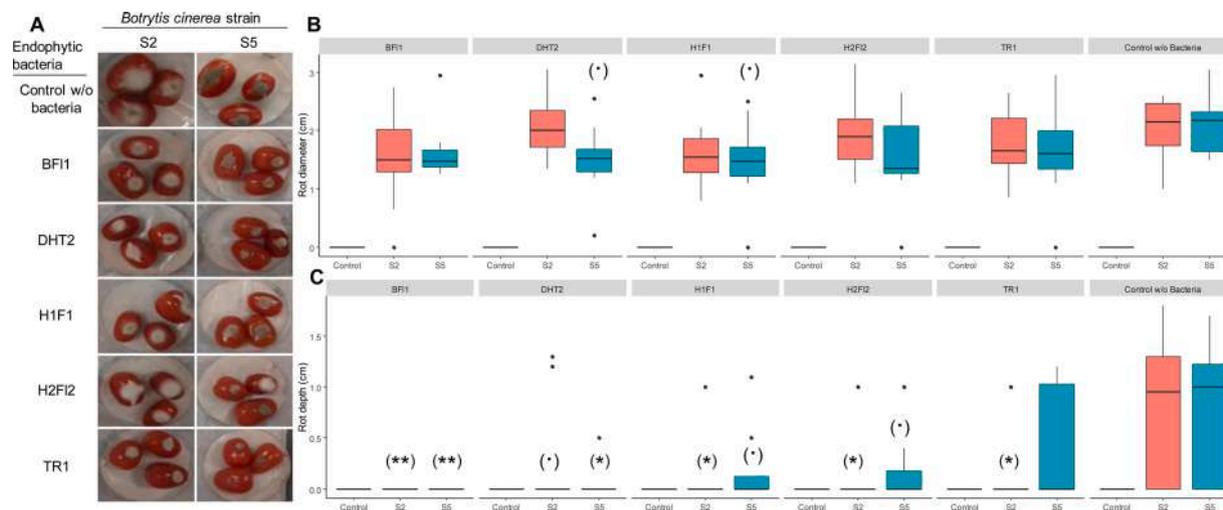
A split plot design was used in this assay. The experiment was repeated three times with two blocks for each replicate. Data were analyzed with a mixed linear model where endophytic bacteria, *B. cinerea* strains (S2 and S5) and their interaction were treated as fixed effects, whereas replicate, Block and whole plot (Plastic box) were treated as random effects. The data of mock-inoculated fruits *i.e.* fruits inoculated with PDA medium instead of the *B. cinerea* culture were not included in the statistical analysis. Significance codes for *p*-values: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 . 1.

prospected localities (< 53 km), an important difference in term of number and species of endophytic bacteria strains was observed. Such substantial differences in endophytic bacterial communities, at a small geographically scale, may be explained by the difference in the soil composition and the cropping system of the farm (Vos and Velicer, 2006; Vos et al., 2013). At the plant organ level, the results showed a dominance of bacteria strains isolated from tomato leaves in comparison to other plant organs. Such result may be related to the known faculty of endophytes to migrate from roots to the upper organs of the plant to reach the leaves (Bodenhausen et al., 2013; Rekosz-Burlaga et al., 2014). The abundant colonization of leaves may indicate the contribution of these microorganisms to the efficiency of photosynthesis, and/or to the protection of these vital organs from diseases. Indeed, several works demonstrate the beneficial use of endophytic microorganisms on photosynthesis by increasing chlorophyll content, photochemical efficiency, or net CO<sub>2</sub> assimilation rate (Rho and Kim, 2017; Mnasri et al., 2017) as well as their protection properties against pathogens (Pavithra et al., 2020). Accordingly, *in vitro* antagonistic tests against *B. cinerea* showed that 18 bacteria strains of the collection produce VOCs with antifungal activity. As evidenced by 16S rRNA sequencing, those belong to different species of *Bacillus* and *Enterobacter* genera with a significant enrichment in strains of the *Bacillus* genus. *Bacillus* strains colonizing plants are involved in many physiological and stress tolerance processes

improving plants growth and health (Earl et al., 2008; Mnasri et al., 2017). In this study, the majority of the identified antagonistic *Bacillus* strains showed neutral to promoting effect on tomato seed germination and seedling growth, implying their role in tomato growth and protection against at least *Botrytis* pathogen. The *Bacillus* genus is already known to harbor potent antagonistic strains to plant pathogens providing effective plant protection through the production of volatile organic compounds (Kefi et al., 2015; Mnasri et al., 2017; Jiang et al., 2018) as well as soluble compounds such as lipopeptides and hydrolytic enzymes (Ben Slimene et al., 2012; Slimene et al., 2015). To our knowledge this is the first report of VOCs antifungal activity against *B. cinerea* produced by *B. nakamurai*, *B. pseudomycooides*, *B. proteolyticus*, *B. thuringiensis*, as well as *Enterobacter asburiae* and *E. cloacae*. Nevertheless, *Bacillus* species like *B. amyloliquefaciens* (Gotor-Vila et al., 2017), *B. velezensis* (Gao et al., 2018; Jiang et al., 2018), *B. subtilis* (Gao et al., 2017; Zhao et al., 2019), *B. vallismortis* (Liu et al., 2018) and *B. toyonensis* (Contreras-Pérez et al., 2019) are known to produce antifungal VOCs against several phytopathogens including *B. cinerea*.

The isolated endophytic *Enterobacter* species (*E. asburiae* and *E. cloacae*) produced antifungal VOCs against *B. cinerea*. Various *Enterobacter* species are known to colonize internal plant tissues, improve plant growth and prevent from pathogens attacks (Tsuda et al., 2001; Jha et al., 2011; Latha et al., 2019; Singh et al., 2020). Previous studies showed that *E. asburiae* strains KDKS5-49 and Vt-7 produce antifungal VOCs against *Phytophthora capsici* (Toh et al., 2016) and *Aspergillus flavus* (Gong et al., 2019), respectively. *Enterobacter cloacae* have antifungal activity against several pathogens such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* (Tsuda et al., 2001), *Mycosphaerella fijiensis* (Macedo-Raygoza et al., 2019), *Sclerotium rolfsii* (Mahartha and Suprapta, 2018) and *Phytophthora sojae* (Zhao et al., 2018).

The correlation between VOC-mediated antifungal and PGP activities did not show any significant relation between both properties. Two hypotheses can be made: firstly, our results may support the specialization of endophytic bacteria toward antagonism or PGP capacities; secondly, the used protocol (double culture assay) for the activities testing may be in favor of selecting antagonistic strains at the expense of PGP strains because of the high concentration of VOCs. The first hypothesis is supported by the work of Walitang et al. (2017) showing that specific type strains isolated from different rice cultivars have distinguishing characteristics, which indicates a certain specificity in their activities. For example, *Flavobacterium* sp. strains are phosphate solubilisers and indole-3-acetic acid producers, whereas *Pseudomonas*



**Fig. 8.** Effect of treatment with vegetative cells of five endophytic bacteria strains on *Botrytis cinerea* infection on tomato fruit. (A) Photos of tomato fruits treated or not (control without bacteria) with bacterial cell suspension at six days after infection with *B. cinerea* S2 or S5 strains. Boxplots represent the diameter (B) and the depth (C) of fruit rotting caused by S2 and S5 *B. cinerea* strains or mock condition (Control) at 6 d after infection. Data are of three independent experiments. Asterisks or dots into brackets indicate significant difference compared to the treatment “Without bacteria” as revealed by Dunnett’s test. Significance code for *p*-values: 0 ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*\*’ 0.05 ‘\*’ 0.1 ‘.’ 1.

**Table 8**

Type III analysis of variance of *Botrytis cinerea* mycelia growth in presence of the pure volatile compound 3-Methylbutan-1-ol (3-MBO) at 5 days of co-culture.

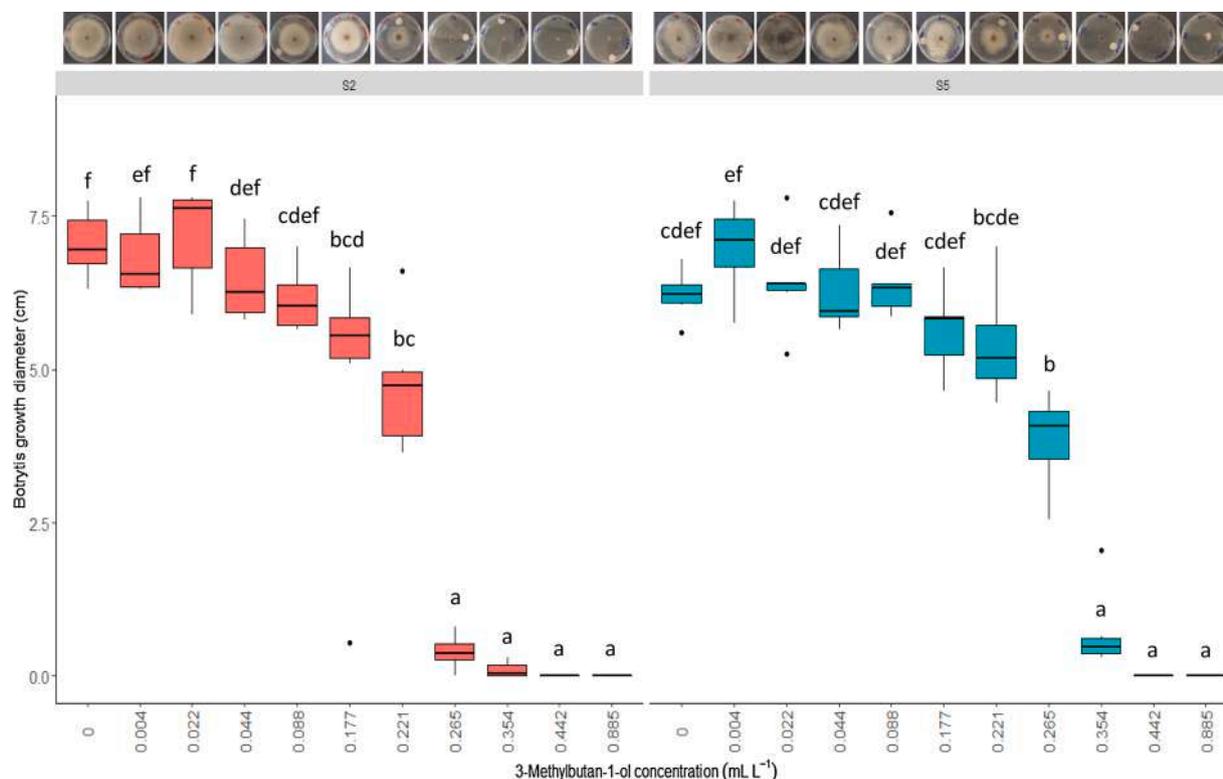
Source of variation	df	Fungal mycelia growth	
		F value	Pr(>F)
Fungal strain	1	8.1848	0.005065 **
3-MBO concentration	10	177.8352	< 2.2e-16 ***
Fungal strain*3-MBO concentration	10	6.9283	2.546e-08 ***

Data were analysed with a mixed linear model where 3-Methylbutan-1-ol concentration and *B. cinerea* strains and their interaction were considered as fixed effects and independent experiment was treated as a random effect. Significance codes for *p*-values: 0 ‘\*\*\*\*’ 0.001 ‘\*\*\*’ 0.01 ‘\*\*’ 0.05 ‘\*’ 0.1 ‘.’ 1.

strains are characterized as high siderophore producers while *Microbacterium* sp. and *Xanthomonas* sp. strains have very high pectinase and cellulase activity (Walitang et al., 2017). The second hypothesis is supported by the work of Asari et al. (2016) indicating that plant promoting and antagonistic activity by VOCs are dose dependent: while PGP activity needs low concentration of volatiles, the antagonistic one needs high volatiles concentration. At the practical level the specification observed in biological activities of endophytic bacteria constitutes a challenge for developing broad-spectrum bio-inocula for agriculture use. This issue can be managed by developing inocula containing a consortium of compatible bacteria strains with complementary biological activities as reported in previous works (Thakkar and Saraf, 2015; Palmieri et al., 2017; Taha et al., 2019). Based on these results we selected endophytic bacteria strains that have strong VOCs antifungal activities and as much as possible neutral to promoting effects on tomato seed germination and seedling growth. Four *Bacillus* strains (BF11, DHT2, H1F1 and H2F12) and one *Enterobacter* strain (TR1) were selected and used for postharvest control of *B. cinerea* on tomato fruit using their VOCs and vegetative cells. The activities of cellulase, pectinase, amylase, phytase, xylanase and chitinase were also observed in almost all of the selected endophytic bacteria strains indicating the importance of these characteristics for survival and colonization into the plant tissues. These bacterial endophytes also showed promising PGP enzymatic activities including ammonia and siderophore production and phosphate solubilization. The selected *Bacillus* strains decreased significantly fruit rot caused by *B. cinerea* mainly using vegetative cells probably due

to their ability to produce several hydrolytic enzymes as indicated above. According to Essghaier et al. (2009), the biocontrol of *B. cinerea* on strawberry fruit was correlated to production of hydrolytic enzymes (chitinase, cellulase, protease,  $\beta$ -1,3-glucanase) by *Bacillus* spp. strain 1502. In addition, Zhang et al. (2010) showed that the release of glucanase, chitinase and proteases by *Aureobasidium pullulans* PL5 strain control postharvest disease caused by *M. laxa* in apple and peach. In comparison to the selected *Bacillus* strains, the *Enterobacter* strain TR1 showed the most protective effect of tomato fruit against *B. cinerea* rotting through its VOCs. As a potential clinical specimen, this strain cannot be applied directly on plants but the bioactive VOCs it emits can be used for the biocontrol of gray mold and potentially tested against other postharvest fungal pathogens.

The GC–MS identification of bacterial VOCs showed a core set of seven compounds produced by all five selected antifungal endophytic bacteria strains i.e. 1-Octyn-3-ol,4-ethyl;  $\beta$ -Fenchol; Benzene,m-di-tert-butyl; 2-Undecanone; 3,3,5-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-2,8-dione; 2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl and unidentified compound. These ubiquitous VOCs may be involved in vital biological processes in bacteria such as communication, environmental adaptation and defense against other microbes (Chernin et al., 2013; Audrain et al., 2015). Indeed, volatiles of ketone group like 2-Undecanone are synthesized by different bacteria genera and known for their antibacterial activity (Melkina et al., 2017; Veselova et al., 2019). Some bacteria strains such as TR1 and DHT2 emitted sulfur-containing compounds, including dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide known for their antifungal activities against several pathogens including oomycete such as *Pythium myriotylum* and *Phytophthora capsici* (Agisha et al. 2019) and fungi such as *Rhizoctonia solani*, *Athelia rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe oryzae*, *Gibberella moniliformis* and *B. cinerea* (Elkahoui et al., 2015; Hernández-León et al., 2015; Agisha et al. 2019). The DHT2 and H1F1 strains produced Cyclohexanol,4-methyl and 2-Heptanone, 6-methyl which were related to *Bacillus* spp. antifungal activities (Fernando et al., 2005; Morita et al., 2019). The TR1 and H2F12 strains produced 2-Heptanone which was reported to have insecticidal and antifungal activities specially against *Pythium irregular*, *R. solani*, and *F. oxysporum* (Cole and Blum, 1975) and has been also related to the antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* DA12 against *Fusarium* species (Lee et al., 2017). The H2F12 strain produced seven strain-specific volatiles with the Dodecanal as a major compound; this has antifungal (*R. solani* and *Bipolaris oryzae*) and antibacterial activities (*Xanthomonas*



**Fig. 9.** *In vitro* antifungal activity of 3-Methylbutan-1-ol against two *Botrytis cinerea* strains S2 and S5. The antifungal activity was assessed as the decrease in fungal mycelia growth compared to the control condition 'without 3-Methylbutan-1-ol' on PDA medium at 5 d of co-culture. A representative plate at 5 d of co-culture is shown for each 3-Methylbutan-1-ol concentration-fungus strain combination. Two independent replicates with three plates for each combination of 3-Methylbutan-1-ol concentration and fungal strains were carried out. Letters identify significantly different groups according to Tukey test for multiple mean comparisons (\* $P < 0.05$ ).

**Table 9**

Type III analysis of variance of *Botrytis cinerea* infection on tomato fruit in presence of the pure volatile compound 3-Methylbutan-1-ol (3-MBO) at 6 days post infection.

Source of variation	df	Diameter of rotting		Depth of rotting	
		F value	Pr(>F)	F value	Pr(>F)
Fungal_strain	1	6.6690	0.01513*	0.1437	0.7074
3-MBO concentration	2	17.5157	1.028e-05***	4.1905	0.0252*
Fungal_strain*3-MBO concentration	2	1.8062	0.18227	0.1437	0.8668

A split plot design was used in this assay and the experiment was repeated two times. Data were analysed with a mixed linear model where 3-Methylbutan-1-ol concentration, *B. cinerea* strain (S2 and S5) and their interaction were considered as fixed effects, whereas the replicate was treated as random effect. The data of mock-inoculated fruits i.e. fruits inoculated with PDA medium instead of the *B. cinerea* culture were not included in the statistical analysis. Significance codes for *p*-values: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1.

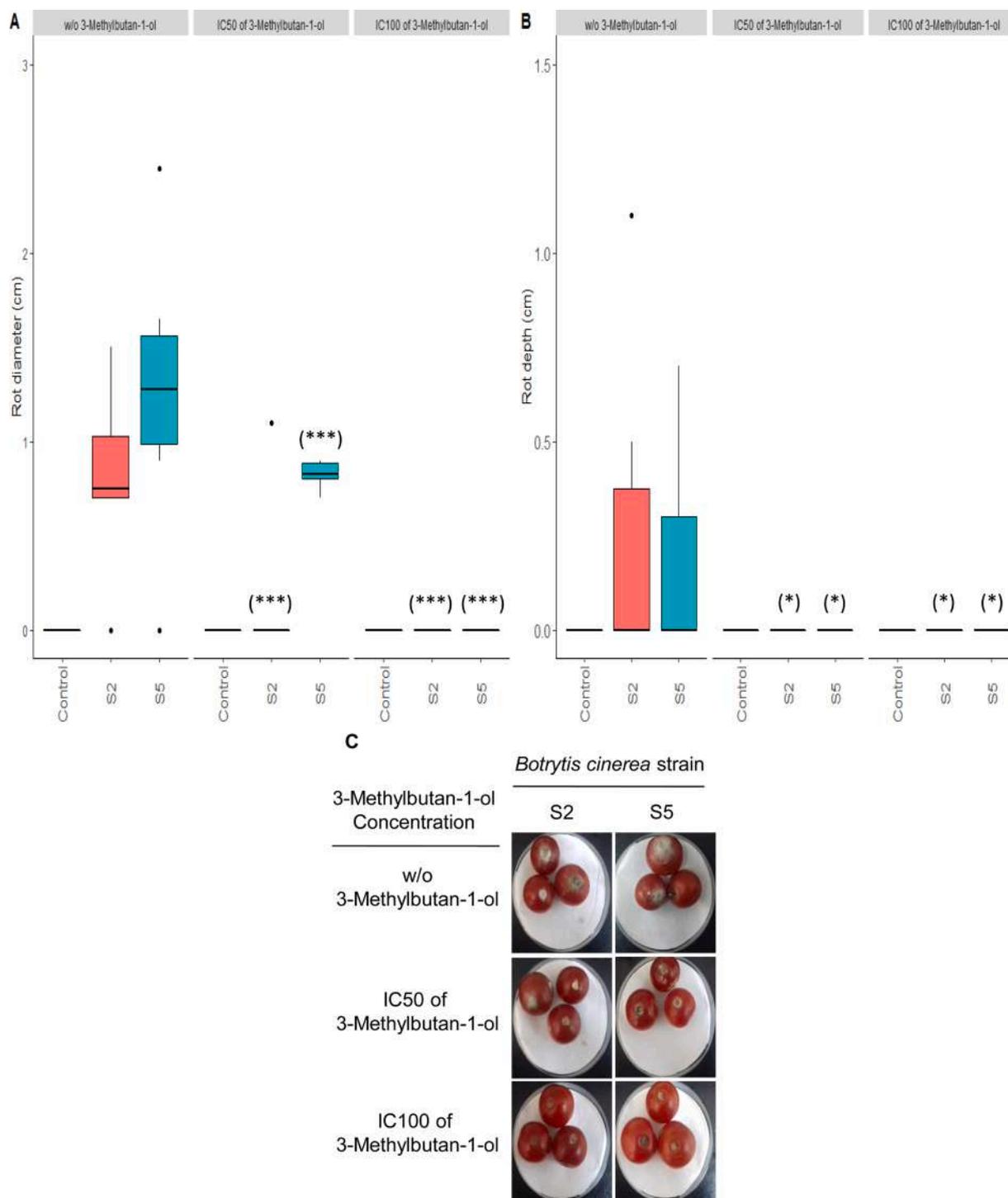
*oryzae*) as pure compound (Chanprapai et al., 2018) and is also related to endophytic bacterial antagonism (Kai et al., 2007; Li et al., 2015). Interestingly, H1F1 and BF11 *Bacillus* strains produce three and six specific VOCs, respectively of unknown antimicrobial activity; suggesting that they could be new bioactive VOCs for the control of *B. cinerea*. Further analysis should be done to identify these volatiles and study their antifungal activities.

The VOCs produced by the *Enterobacter* strain TR1 had the most important *in vivo* protective effect against *B. cinerea* decay on tomato fruit. In total, the TR1 strain produces 57 VOCs (at 7 and 14 d) with two of them (3-Methylbutan-1-ol and 2-Furanmethanol) considered as biomarkers of *E. cloacae* (Lawal et al., 2018) and three compounds

(3-Methylbutan-1-ol, Pentadecane and 2-Octanone) previously reported for their antifungal activities (Li et al., 2020). This study showed a notable antifungal activity of the major volatile compound 3-Methylbutan-1-ol produced by TR1 strain which totally suppress *B. cinerea* infection at 0.442 mL L<sup>-1</sup> headspace with no visible alteration on tomato fruit. Calvo et al. (2020) showed also that 3-Methylbutan-1-ol had antifungal activity against *B. cinerea* at 0.1 mL L<sup>-1</sup> in table grapes. The difference between the effectiveness of 3-Methylbutan-1-ol antifungal activity in this study in comparison to Calvo et al. (2020) may be explained in part by the difference of the reaction of the used *B. cinerea* strains. This is supported by the fact that we observed a significant difference between the sensitivity of the S2 and S5 *B. cinerea* strains in reaction to 3-Methylbutan-1-ol. So, prior to the application of this potential antifungal volatile, it is crucial to determine not only the active dose but also its spectrum of activity against different fungal strains, phytotoxicity on various fruit species and effects on fruit quality.

### 5. Conclusion

In conclusion this study showed that healthy tomato plants harbor diverse endophytic bacteria strains colonizing mainly leaves and some of them emitting VOCs with antifungal and/or plant growth promotion activity. Identified antagonistic bacteria strains showed a significant enrichment with *Bacillus* species with few *Enterobacter* species. The activities of several hydrolytic enzymes were also observed in almost all selected endophytic bacteria, along with promising plant growth promoting enzymatic activities. The characterization of bacterial-released VOCs showed a core set of compounds produced by all selected bacteria, and some strain-specific volatiles, with some of them already reported for their antifungal activities. Finally, this work provides evidence about VOCs- and vegetative cells-mediated biocontrol ability



**Fig. 10.** Effect of 3-Methylbutan-1-ol on *Botrytis cinerea* infection on tomato fruit. Boxplots represent the diameter (A) and the depth (B) of rotting caused by S2 and S5 *Botrytis cinerea* strains or control condition (inoculated with PDA medium) at 6 d after infection on tomato fruit exposed or not to 3-Methylbutan-1-ol at the half maximal inhibitory concentration (IC50 = 0.221 mL L<sup>-1</sup>) and the maximal inhibitory concentration (IC100 = 0.442 mL L<sup>-1</sup>). (C) Photos of tomato fruit at 6 d after infection with *B. cinerea* strains and exposed or not to IC50 and IC100 of 3-Methylbutan-1-ol. Data were recorded from two independent experiments. Asterisk into brackets indicates significant difference between *B. cinerea* inoculated fruit in presence or not of 3-Methylbutan-1-ol as revealed by Dunnett's test (\*P < 0.05). Significance codes for p-values: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1.

of *Enterobacter* and *Bacillus* strains, respectively to reduce postharvest infection of *B. cinerea* on tomato fruit, as well as 3-Methylbutan-1-ol as promising antifungal volatile to control grey mould during storage and trade transport. Although, no visible alteration were observed on tomato fruit after the application of 3-Methylbutan-1-ol phytotoxicity tests should be done prior to application.

**Author contributions**

MC and TK: conduction of the experiments.  
 MC, CB: statistical analysis of data.  
 SJ and SE: analysis and identification of volatile compounds.  
 ND, MC, CB, LG: analysis and interpretation of results.  
 ND, MC, CB: writing and correction of the paper.

CB, LG and ND: work supervision.

## Funding

This work was financially supported by the Tunisian-French PHC-Utique collaborative project (CMCU code 17G0902 / Campus France code 37119QF) and by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

## Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111389>.

## References

- Abbey, J.A., Percival, D., Abbey, Lord, Asiedu, S.K., Prithiviraj, B., Schilder, A., 2019. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol Sci. Technol.* 29, 241–262. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>.
- Andreu, L.V., 2013. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Methods Enzymol.* 529, 143–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00011-2>.
- Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., Vero, S., 2017. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biol. Control* 109, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.002>.
- Asari, S., Matzén, S., Petersen, M.A., Bejai, S., Meijer, J., 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070>.
- Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.M., Ghigo, J.M., 2015. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 222–233. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu013>.
- Bakker, A.W., Schippers, B., 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19, 451–457. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90037-X).
- Ben Slimene, I., Tabbene, O., Djebali, N., Cosette, P., Schmitter, J.M., Jouenne, T., Urdaci, M.C., Limam, F., 2012. Putative use of a *Bacillus subtilis* L194 strain for biocontrol of *Phoma medicaginis* in *Medicago truncatula* seedlings. *Res. Microbiol.* 163, 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.03.004>.
- Bodenhansen, N., Horton, M.W., Bergelson, J., 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>.
- Bolívar-Anillo, H.J., Garrido, C., Collado, I.G., 2019. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochem. Rev.* 5. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>.
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A.P., Blanco, D., Venturini, M.E., 2020. Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biol. Technol.* 166, 111208. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111208>.
- Capuccino, J.G., Sherman, N., 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual*, p. 507. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco.
- Chanprapai, P., Chavasi, W., Kubo, I., 2018. Anti-rice pathogenic microbial activity of *Persicaria* sp. Extracts. *Sci. Technol. Asia* 23 (4), 32–41. <https://doi.org/10.14456/scitechasia.2018.30>.
- Chernin, L., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Khmel, I., 2013. Quorum-sensing quenching by volatile organic compounds emitted by rhizosphere bacteria. *Mol. Microb. Ecol. Rhizosph.* 2, 791–800. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch75>.
- Cole, L.K., Blum, M.S., 1975. Antifungal properties of the insect alarm pheromones, citral, 2-heptanone, and 4-methyl-3-heptanone. *Mycologia* 67, 701–708. <https://doi.org/10.2307/3758330>.
- Combrinck, S., Regnier, T., Kamatou, G.P.P., 2011. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Ind. Crops Prod.* 33, 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.011>.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Christophe, C., Barka Ait, E., 2005. PAS 100:2011 specification for composted materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1–68. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951>.
- Contreras-Pérez, M., Hernández-Salmerón, J., Rojas-Solís, D., Rocha-Granados, C., Orozco-Mosqueda, M., del, C., Parra-Cota, F.I., de los Santos-Villalobos, S., Santoyo, G., 2019. Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. *Biloxi*) growth-promoting bacterium. *3 Biotech* 9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1911-5>.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- Dhouib, H., Zouaria, I., Ben Abdallah, D., Belbahri, L., Taktaka, W., Triki, M.A., Tounsi, S., 2019. Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. *Biol. Control* 139, 104092. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104092>.
- Durham, D.R., Stewart, D.B., Stellweg, E.J., 1987. Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J. Bacteriol.* 169, 2762–2768. <https://doi.org/10.1128/jb.169.6.2762-2768.1987>.
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>.
- Elkhoui, S., Djébal, N., Yaich, N., Azaiez, S., Hammami, M., Essid, R., Limam, F., 2015. Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas* P2 strain against *Rhizoctonia solani*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 175–185. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1772-3>.
- Essghaier, B., Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Hajlaoui, M.R., Boudabous, A., Jijakli, H., Sadfi-Zouaoui, N., 2009. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 106, 833–846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04053.x>.
- Fernando, W.D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S., Savchuk, S.C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* 37, 955–964.
- Fillinger, S., Elad, Y., 2015. Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. *Botrytis - Fungus, Pathog. Its Manag. Agric. Syst.*, pp. 1–486. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>.
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., Zhang, Y., 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 105, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>.
- Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., Guan, W., 2018. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00456>.
- Gong, A.D., Dong, F.Y., Hu, M.J., Kong, X.W., Wei, F.F., Gong, S.J., Zhang, Y.M., Zhang, J.B., Wu, A.B., Liao, Y.C., 2019. Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. *Food Control* 106. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106718>.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol.* 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>.
- Gupta, P., Samant, K., Sahu, A., 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int. J. Microbiol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>.
- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-garrido, C., Roudet, J., Deschamps, A., Ar, R.H., Fermaud, M., Arrido, C.C., Roudet, J., Deschamps, A., 2017. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathol. Mediterr.* 55, 301–322. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol.Mediterr-18079>.
- Hankin, L., Zucker, M., Sands, D.C., 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22, 205–209. <https://doi.org/10.1128/aem.22.2.205-209.1971>.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M., del, C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* 81, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>.
- Hsu, S.C., Lockwood, J.L., 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29, 422–426. <https://doi.org/10.1128/aem.29.3.422-426.1975>.
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., Shipping, T., 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing postharvest decay in fruits and vegetables. *Food Qual. Saf.* 2, 111–119. <https://doi.org/10.1093/fqsaf/fyy016>.
- Jha, C.K., Aeron, A., Patel, B.V., Dinesh, K., 2011. Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses. *Bact. Agrobiol. Plant Growth Responses*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9>.
- Jiang, C.H., Liao, M.J., Wang, H.K., Zheng, M.Z., Xu, J.J., Guo, J.H., 2018. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 126, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.017>.
- Jin, W., Wu, F., 2015. Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves. *BMC Plant Biol.* 15, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0410-4>.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla, B., 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187, 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0199-0>.
- Kefi, A., Ben Slimene, I., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaiez, S., Bejaoui, M., Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T., Limam, F., 2015. Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1967–1976. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1943-x>.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., Apajalahti, J., 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from

- Bacillus subtilis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2079–2085. <https://doi.org/10.1128/aem.64.6.2079-2085.1998>.
- Khan, A.W., Tremblay, D., LeDuy, A., 1986. Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures. Enzyme Microb. Technol. 8, 373–377. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90139-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90139-0).
- Latha, P., Karthikeyan, M., Rajeswari, E., 2019. Endophytic bacteria: prospects and applications for the plant disease management. In: Ansari, R., Mahmood, I. (Eds.), Plant Health Under Biotic Stress. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_1).
- Lawal, O., Knobel, H., Weda, H., Nijssen, T.M.E., Goodacre, R., Fowler, S.J., 2018. TD/GC-MS analysis of volatile markers emitted from mono- and co-cultures of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* in artificial sputum. Metabolomics 14, 66. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1357-5>.
- Lee, T., Park, D., Kim, K., Lim, S.M., Yu, N.H., Kim, S., Kim, H.Y., Jung, K.S., Jang, J.Y., Park, J.C., Ham, H., Lee, S., Hong, S.K., Kim, J.C., 2017. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic fusarium species. Plant Pathol. J. 33, 499–507. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.06.2017.0126>.
- Li, X.Y., Mao, Z.C., Wu, Y.X., Ho, H.H., He, Y.Q., 2015. Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. Biocontrol Sci. Technol. 25, 132–143. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.960809>.
- Li, X., Li, B., Cai, S., Zhang, Y., Xu, M., Zhang, C., Yuan, B., Xing, K., Qin, S., 2020. Identification of rhizospheric actinomycete *Streptomyces lavendulae* sps-33 and the inhibitory effect of its volatile organic compounds against *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Microorganisms 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030319>.
- Liu, C., Yin, X., Wang, Q., Peng, Y., Ma, Y., Liu, P., Shi, J., 2018. Antagonistic activities of volatiles produced by two *Bacillus* strains against *Monilinia fructicola* in peach fruit. J. Sci. Food Agric. 98, 5756–5763. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9125>.
- Macedo-Raygoza, G.M., Valdez-Salas, B., Prado, F.M., Prieto, K.R., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Canto-Canché, B.B., Carrillo-Beltrán, M., Di Mascio, P., White, J.F., Beltrán-García, M.J., 2019. *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black sigatoka pathogen. Front. Microbiol. 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00804>.
- Mahartha, K.A., Suprapta, D.N., 2018. Efficacy of *Enterobacter cloacae* KtB3 to control damping-off disease on soybean caused by *Sclerotium rolfsii*. Int. J. Agric. Biol. 20, 871–876. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0578>.
- Melkina, O.E., Khmel, I.A., Plyuta, V.A., Koksharova, O.A., Zavilgelsky, G.B., 2017. Ketones 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-undecanone inhibit DnaK-dependent refolding of heat-inactivated bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells lacking small chaperon IbpB. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 5765–5771. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8350-1>.
- Mnasri, N., Chennaoui, C., Gargouri, S., Mhamdi, R., Hessini, K., Elkahoui, S., Djébali, N., 2017. Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria in vitro and as seed coating for the control of *Fusarium culmorum* infecting durum wheat in Tunisia. Eur. J. Plant Pathol. 147, 501–515. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1018-3>.
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., Someya, T., 2019. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. Heliyon 5, e01817. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>.
- Nair, D.N., Padmavathy, S., 2014. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. Sci. World J. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/250693>.
- Palmieri, D., Vitullo, D., De Curtis, F., Lima, G., 2017. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against fusarium decline of chickpea. Plant Soil 412, 425–439. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3080-1>.
- Paradis, E., Schliep, K., 2019. Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. Bioinformatics 35, 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>.
- Pavithra, G., Bindal, S., Rana, M., Srivastava, S., 2020. Role of endophytic microbes against plant pathogens: a review. Asian J. Plant Sci. 19, 54–62. <https://doi.org/10.3923/ajps.2020.54.62>.
- Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species.
- Rekosz-Burlaga, H., Borys, M., Goryluk-Salmonowicz, A., 2014. Cultivable microorganisms inhabiting the aerial parts of *Hypericum perforatum*. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 13, 117–129.
- Rho, H., Kim, S.H., 2017. Endophyte effects on photosynthesis and water use of plant hosts: a meta-analysis. Functional importance of the Plant Microbiome, pp. 43–69.
- Rouissi, W., Ugolini, L., Martini, C., Lazzeri, L., Mari, M., 2013. Control of postharvest fungal pathogens by antifungal compounds from *Penicillium expansum*. J. Food Prot. 76, 1879–1886. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-072>.
- Saito, S., Michailides, T.J., Xiao, C.L., 2019. Fungicide-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* populations and their impact on control of gray mold on stored table grapes in California. Eur. J. Plant Pathol. 154, 203–213. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01649-z>.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiol. Res. 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.
- Schliep, K.P., 2011. Phangorn: Phylogenetic Analysis in R. Bioinformatics, 27, pp. 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>.
- Schliep, K., Potts, A.J., Morrison, D.A., Grimm, G.W., 2017. Intertwining phylogenetic trees and networks. Methods Ecol. Evol. 8, 1212–1220. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12760>.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160, 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Singh, M., Meenakshi, S., Kumar, A., Singh, A.K., Pandey, K.D., 2020. Endophytic bacteria in plant disease management. In: Kumar, A., Singh, V.K. (Eds.), Microbial Endophytes: Prospects for Sustainable Agriculture. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818734-0.00004-8>.
- Slimene, I.B., Tabbene, O., Gharbi, D., Mnasri, B., Schmitter, J.M., Urdaci, M.C., Limam, F., 2015. Isolation of a chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 strain exerting a biological control against *Phoma medicaginis* infection. Appl. Biochem. Biotechnol. 175, 3494–3506. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1520-7>.
- Taha, M.D.M., Jaini, M.F.M., Saidi, N.B., Rahim, R.A., Shah, U.K.M., Hashim, A.M., 2019. Biological control of *Erwinia mallotivora*, the causal agent of papaya dieback disease by indigenous seed-borne endophytic lactic acid bacteria consortium. PLoS One 14, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224431>.
- Thakkar, A., Saraf, M., 2015. Development of microbial consortia as a biocontrol agent for effective management of fungal diseases in Glycine max L. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 48, 459–474. <https://doi.org/10.1080/03235408.2014.893638>.
- Toh, S.C., Samuel, L., Awang, A.S.A.H., 2016. Screening for antifungal-producing bacteria from *Piper nigrum* plant against *Phytophthora capsici*. Int. Food Res. J. 23, 2616–2622.
- Tsuda, K., Kosaka, Y., Tsuge, S., Kub, Y., Horin, A.O., 2001. Evaluation of the endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 isolated from spinach roots for biological control against *Fusarium wilt* of spinach. J. Gen. Plant Pathol. 67, 78–84.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Front. Plant Sci. 4, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>.
- Van Kan, J.A.L., Shaw, M.W., Grant-Downton, R.T., 2014. Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? Mol. Plant Pathol. 15, 957–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12148>.
- Vaseekaran, S., Balakumar, S., Arasaratnam, V., 2011. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable  $\alpha$ -amylase. Trop. Agric. Res. 22, 1. <https://doi.org/10.4038/tar.v22i1.2603>.
- Veselova, M.A., Plyuta, V.A., Khmel, I.A., 2019. Volatile compounds of bacterial origin: structure, biosynthesis, and biological activity. Microbiol. (Russian Fed.) 88, 261–274. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030160>.
- Vos, M., Velicer, G.J., 2006. Genetic population structure of the soil bacterium *Myxococcus xanthus* at the centimeter scale. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3615–3625. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3615-3625.2006>.
- Vos, M., Wolf, A.B., Jennings, S.J., Kowalchuk, G.A., 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. FEMS Microbiol. Rev. 37, 936–954. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12023>.
- Walitang, D.I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y.K., Kang, Y., Sa, T., 2017. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. BMC Microbiol. 17, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173, 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18 (1), 315–322.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Mol. Plant Pathol. 8, 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. Biol. Control 54, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.003>.
- Zhao, L.F., Xu, Y.J., Lai, X.H., 2018. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. Braz. J. Microbiol. 49, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.007>.
- Zhao, P., Li, P., Wu, S., Zhou, M., Zhi, R., Gao, H., 2019. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. AMB Express 9. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0841-2>.
- Zheng, L., Situ, J., Zhu, Q., Xi, P., Zheng, Y., Liu, H., Zhou, X., Jiang, Z., 2019. Identification of volatile organic compounds for the biocontrol of postharvest litchi fruit pathogen *Peronophythora litchi*. Postharvest Biol. Technol. 155, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.009>.