



**HAL**  
open science

# Mécanismes et applications du potentiel biomodulateur du microbiote associé au blé “Florence aurore” dans la promotion de la croissance et la résistance à *Fusarium culmorum*

Mouadh Saadaoui

► **To cite this version:**

Mouadh Saadaoui. Mécanismes et applications du potentiel biomodulateur du microbiote associé au blé “Florence aurore” dans la promotion de la croissance et la résistance à *Fusarium culmorum*. Amélioration des plantes. Université Clermont Auvergne; Université de Tunis El Manar, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0123 . tel-04562935

**HAL Id: tel-04562935**

**<https://theses.hal.science/tel-04562935v1>**

Submitted on 29 Apr 2024

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

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



## **Thèse de Doctorat**

Présentée à l'Université Clermont Auvergne en cotutelle avec l'Université de Tunis El Manar

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'université en Biologie délivré par l'École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement (EDSVSAE) et l'École Doctorale des Sciences et Technologies du Vivant et des Sciences de la Terre (EDSTVST)

Préparée au sein du

Laboratoire de Physique et Physiologie intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant (UMR-PIAF) et Laboratoire des Grandes Cultures de l'INRAT

# **Mécanismes et Applications du Potentiel Biomodulateur du Microbiote Associé au Blé « *Florence Aurore* » dans la Promotion de la croissance et la Résistance à *Fusarium culmorum***

Présentée par

**M. Mouadh SAADAoui**

Dirigée par

Hatem CHAAR et Philippe LABEL

Soutenue publiquement le 16 Novembre 2023

### **Composition du jury :**

Mme Patricia ROECKEL-DREVET, Professeure, Université Clermont Auvergne - Président  
Mme Imène OUZARI, Professeure, Université de Tunis El Manar - Rapporteur  
M. Thomas GUILLEMETTE, Professeur, Université d'Angers - Rapporteur  
Mme Alia DELLAGI, Professeure, Université Paris-Saclay - Examineur  
M. Philippe LABEL, Directeur de recherche, INRAE - Co-directeur de thèse  
M. Hatem CHAAR, Maître de conférences, Institut National Agronomique de Tunisie - Co-directeur de thèse  
Mme Valérie PUJADE-RENAUD, Directeur de recherche, CIRAD - Membre invité  
M. Jean-Stéphane VENISSE, Maître de conférences, Université Clermont Auvergne - Membre invité

*« Lorsque les sciences dévoilent les secrets de la nature,  
ce que celle-ci perd de mystérieux, elle le gagne en  
merveilleux »*

**Paul Carvel**

*Je dédie cette thèse ...*

*A mes parents*

*Qui m'ont permis de faire les études et qui  
m'ont toujours soutenu moralement et  
financièrement*

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma  
grande affection et mon éternelle  
reconnaissance pour leur soutien  
constant, leur dévouement et leur  
confiance, Je leur dois ce que je suis  
aujourd'hui et ce que je serai demain.*

*A mon frère et ma sœur*

*Pour leurs encouragements tout au long  
de ces années et pour tous nos bons  
moments passés ensemble et pour les liens  
solides qui nous unissent.*

*A toute la Famille SAADAOUI et HAJRI*

*Enfin à tous ceux qui m'ont aidé à  
devenir ce que je suis.*

## *Remerciements*

L'achèvement de ce travail mené sur plusieurs années procure une grande satisfaction. Il est l'occasion de se remémorer les différents défis qu'il a fallu surmonter mais surtout, les personnes qui m'ont permis d'en arriver là.

Tout d'abord, je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et me permettant ainsi, par leurs critiques, de partager une partie de leur savoir.

Je me ferais un agréable devoir et plaisir de remercier mon co-directeur de thèse français Pr. **Philippe LABEL** directeur de recherche et Directeur de l'UMR « Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant » (UMR-PIAF) pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je vous remercie pour vos conseils judicieux et pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises.

Je tiens également à remercier mon co-directeur de thèse tunisien Pr. **Hatem CHAAR**, maître de conférence à l'Institut National Agronomique de Tunisie (INAT), pour ses conseils et remarques constructives. Il peut être assuré de mon sincère respect et de ma profonde gratitude.

Ma plus grande gratitude va à mon encadrant M. **Jean-Stéphane VENISSE**, maître de conférence à l'université Clermont Auvergne (UCA), pour sa disponibilité, la confiance qu'il m'a accordée et le temps qu'on a partagé ensemble au laboratoire. J'aimerais aussi le remercier pour l'autonomie qu'il m'a accordée, ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail et surtout, son soutien morale et financier.

Je remercie aussi Pr. **Mohamed KHARRAT**, directeur du Laboratoire des Grandes Cultures (LGC) de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT) pour son aide précieuse et ses qualités humaines. Qu'il trouve dans ce travail ma gratitude.

Je remercie tous les membres de l'UMR PIAF et GDEC, Norbert mon collègue de bureau qui m'a trop gâté avec ses gâteaux, Amélie pour son pouvoir magique sur mes plantes en chambre de culture, Bamba pour ses idées de génie en extraction d'ADN, Céline et Caroline pour leur multiple coups de main précieux, Aldo pour ses jus smoothie énergétique, Jane pour ses galettes des rois où j'étais toujours « The King », ainsi que tous les doctorants avec qui j'ai partagé des grands moments de plaisir : Erwan, Alex, Maxime, Caroline, Kenza et Tsiky.

Je remercie encore Marc, Jérôme, Nathalie, Felix, Jean Louis, Nicole, Valérie du PIAF, et Saïd et Céline du GDEC avec qui j'ai partagé mon quotidien en restaurant et au coin café.

Mes remerciements s'adressent également aux techniciennes du laboratoire LGC en Tunisie Noura et Sameh, au vice-président de l'association slow Food Nabil Ben Marzouk et au propriétaire de la ferme biologique en Tunisie Amine Ben Abdallah.

Je souhaite enfin remercier tous mes amis sur Lyon et Clermont-Ferrand et ceux qui me connaissent.

Merci à toutes et à tous.

# Sommaire

Abréviations	i
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	v
Résumé	vi
Abstract	vii
Contexte académique et administratif de ma thèse	viii
Introduction et enjeu de la thèse	1
Synthèse bibliographique	3
<b>I. Le blé</b>	<b>6</b>
<b>I.1. Origine géographique, source utile pour l'Humanité et génétique</b>	<b>6</b>
<b>I.2. Biologie et Cycle de développement du blé</b>	<b>7</b>
<b>I.2.1. Appareil végétatif et reproducteur</b>	<b>7</b>
<b>I.2.2. Cycle de développement du blé</b>	<b>9</b>
<b>I.2.2.1. La période végétative</b>	<b>9</b>
<b>I.2.2.2. La période reproductrice</b>	<b>11</b>
<b>I.2.2.3. La période de formation et de maturation du grain</b>	<b>11</b>
<b>I.3. Exigences du blé</b>	<b>13</b>
<b>I.3.1. Sol</b>	<b>13</b>
<b>I.3.2. Température</b>	<b>15</b>
<b>I.3.3. Eau</b>	<b>15</b>
<b>I.3.4. Fertilisation</b>	<b>15</b>
<b>I.4. Domestication et association microbienne</b>	<b>17</b>
<b>I.4.1 Généralités</b>	<b>17</b>
<b>I.4.2. Importance des micro-organismes du sol</b>	<b>18</b>
<b>I.5. Production et Importance économique du blé</b>	<b>18</b>
<b>I.5.1. A l'échelle mondiale</b>	<b>18</b>
<b>I.5.2. Situation en Tunisie</b>	<b>20</b>
<b>II. Les maladies fongiques du blé</b>	<b>22</b>
<b>II.1. Les maladies causées par <i>Fusarium culmorum</i></b>	<b>22</b>
<b>II.1.1. Le genre <i>Fusarium</i></b>	<b>22</b>
<b>II.1.2. <i>Fusarium culmorum</i></b>	<b>23</b>
<b>II.2. Les fusarioses causées par <i>Fusarium culmorum</i></b>	<b>23</b>
<b>II.2.1. Mode de contamination</b>	<b>23</b>
<b>II.2.2. Plantes hôtes</b>	<b>23</b>
<b>II.2.3. Pouvoir pathogène</b>	<b>26</b>
<b>II.2.4. Epidémiologie</b>	<b>26</b>
<b>II.3. La fusariose des semences</b>	<b>26</b>

II.3.1. Incidence	26
II.3.2. Symptomatologie	26
II.3.3. Conditions favorables	27
II.3.4. Mécanisme d'infection	27
II.4. La fusariose des racines et du collet	30
II.4.1. Mécanismes d'infection	30
II.4.2. Fusariose de l'épi	30
II.4.3. Mécanisme d'infection	31
II.5. Cycle de vie de <i>Fusarium Culmorum</i>	31
II.6. Biosynthèse des mycotoxines chez <i>F. culmorum</i>	31
<b>III. Interaction plante micro-organismes</b>	<b>34</b>
III.1. Généralités	34
III.2. Moyen de lutte contre <i>F. culmorum</i>	34
III.3. Le Biocontrôle et la lutte biologique	35
III.3.1. Les grands Types de lutte biologique	36
III.3.1.1. Lutte biologique par introduction ou acclimatation	36
III.3.1.2. La lutte biologique augmentative	36
III.3.1.3. La lutte biologique par conservation	36
III.3.2. Mécanismes d'action des agents de lutte biologiques	36
III.3.2.1. Interactions trophiques	36
III.3.2.2. Mécanismes d'action des agents de lutte biologique	37
<b>IV. L'immunité innée chez les végétaux - généralités</b>	<b>39</b>
IV.1. Généralités	39
IV.2. La résistance, un événement spatio-temporel pluriel	40
X.2.1. La réaction d'hypersensibilité (HR)	41
IV.2.2. Généralisation de la résistance à travers la plante	42
IV.2.3. Les messagers hormonaux impliqués dans l'immunité innée des végétaux	43
IV.3. La résistance, une série de mécanismes moléculaires très riches	44
IV.3.1. Reconnaissance de l'agent pathogène	44
IV.3.2. Les réponses de défenses à l'infection	48
IV.3.2.1. Les protéines PR	48
IV.3.2.2. Les phytoalexines	49
IV.4. Défenses végétales et objectifs de la thèse	49
<b>Axe de recherche 1 "Microbiome de blé, Origine et diversité"</b>	<b>54</b>
<b>Axe de recherche 2 "<i>Trichoderma</i>"</b>	<b>82</b>
Préambule	83
Article 1 : « Assessment of Tunisian <i>Trichoderma</i> isolates on wheat seed germination, seedling growth and Fusarium Seedling Blight suppression »	87
<b>Axe de recherche 3 "<i>Rhizobacteria</i>"</b>	<b>123</b>
Préambule	124
Article 2 : « Evaluation of Tunisian wheat endophytes as plant growth promoting bacteria and biological control agents against <i>Fusarium culmorum</i> »	128

<b>Discussion générale</b>	177
<b>Conclusion et Perspectives</b>	185
<b>Poster et Congrès</b>	189
<b>Références</b>	192



## Abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNg** : ADN génomique  
**ADNr** : ADN ribosomique  
**AIA** : Acide Indole Acétique  
**AQP** : Aquaporine  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNr** : ARN ribosomique  
**BCA** : Biological Control Agent  
**°C** : Degré Celsius  
**cm** : Centimètre  
**CTAB** : Bromure de cétyltriméthylammonium  
**CWDEs** : Cell Wall Degrading Enzymes  
**DJ** : Degré Jour de croissance  
**DON** : DéOxyNivalénol  
**ET** : EThylène  
**ETS** : Effector Triggered Susceptibility  
**ETI** : Effector Triggered Immunity  
**FAO** : Food and Agriculture Organisation  
**h** : heure  
**HR** : Hypersensitive Reaction  
**HAF** : Halliwell-Asada-Foyer  
**ISR** : Induced Systemic Resistance  
**ITS** : Internal Transcribed Spacer  
**IGS** : Intergenic Spacer  
**JA** : Jasmonic Acid  
**Kb** : kilobase  
**LAR** : Local Acquired Resistance  
**LB** : milieu Luria-Bertani  
**LTP** : Lipid Transfer Proteins  
**M** : Molarité  
**mM** : Millimolaire  
**m** : mètre  
**mm** : millimètre  
**µm** : micromètre  
**MAMP** : Microbe Associated Molecular Patterns  
**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase  
**MIP** : Major Intrinsic Proteins  
**ml** : millilitre  
**Mt** : Millions de tonnes  
**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
**NCBI** : National Center for Biotechnology Information  
**NGS** : Next-Generation Sequencing  
**NIV** : Nivalénol  
**PAMP** : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
**pb** : paire de base  
**PCD** : Programmed Cell Death  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PCW** : Plant Cell Wall  
**PDA** : Potato Dextrose Agar  
**PGP** : Plant Growth Promoting  
**PGPM** : Plant Growth Promoting Microbes

**PGPF** : Plant Growth Promoting Fungi  
**PGPB** : Plant Growth Promoting Bacteria  
**PGPR** : Plant Growth Promoting Rhizobacteria  
**pH** : potentiel hydrogène  
**PMG** : Poids de mille grains  
**PR** : Pathogenesis Related proteins  
**PTI** : PAMP Triggered Immunity  
**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction  
**RBO** : Respiratory Burst Oxydase  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**SAR** : Systemic Acquired Resistance  
**SA** : Salicylic Acid  
**TCAC** : Taux de croissance Annuel Composé  
**TSA** : Tryptic Soy Agar  
**TSM** : Trichoderma selective media  
**UPGMA** : Unweighted Paired Group Mean Arithmetic  
**ZON** : Zéaralénone

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Relations phylogénétiques entre le blé et les principaux genres cultivés les plus proches	4
<b>Figure 2</b>	Morphologie d'épis (A), épillets (B) et grains (C) du blé dur, blé tendre et des graminées sauvages apparentées	5
<b>Figure 3</b>	Phylogénie et chronologie de la domestication du blé	8
<b>Figure 4</b>	Stades de croissance du blé selon les échelles de Zadoks et Feekes	10
<b>Figure 5</b>	Schéma de la structure anatomique d'un grain de blé (coupe longitudinale)	14
<b>Figure 6</b>	Morphologie des spores chez <i>Fusarium</i> spp.	21
<b>Figure 7</b>	Aspect macroscopique d'espèces de <i>Fusarium</i> sur milieu PDA	21
<b>Figure 8</b>	Aspect de <i>Fusarium culmorum</i> sur milieu PDA après 7 jours à 28°C	24
<b>Figure 9</b>	Macroconidies de <i>Fusarium culmorum</i>	24
<b>Figure 10</b>	Manque à la levée due à la fusariose des semences	25
<b>Figure 11</b>	Brûlure des semis de blé dur provoquée par <i>F. culmorum</i>	25
<b>Figure 12</b>	Progression de l'infection des semis de blé issus de graines infectées par <i>F. culmorum</i> 10 jours après la germination	28
<b>Figure 13</b>	Progression de l'infection des semis de blé issus de graines semées dans un sol contaminé par <i>F. culmorum</i> 10 jours après la germination	28
<b>Figure 14</b>	Processus d'infection de <i>F. culmorum</i>	28
<b>Figure 15</b>	Symptômes de la pourriture des pieds et des racines	29
<b>Figure 16</b>	Evolution des symptômes visibles de <i>Fusarium culmorum</i> sur les racines primaires de blé 24h (A), 48h (B) et 96h (C) après l'inoculation	29
<b>Figure 17</b>	Evolution des symptômes visibles de <i>F. culmorum</i> sur la base de la tige de blé des premières (a-d), deuxièmes (e-h) et troisièmes (i-l) gaines foliaires basales à 3, 7, 14 et 21 jours après l'inoculation	29
<b>Figure 18</b>	Développement de <i>F. culmorum</i> sur les racines primaires des semis de blé	32
<b>Figure 19</b>	Colonisation de <i>Fusarium culmorum</i> des premières gaines foliaires basales de blé 3 jours après l'inoculation	32
<b>Figure 20</b>	Symptômes de la fusariose de l'épi causée par <i>Fusarium</i>	32
<b>Figure 21</b>	Coupes transversales de grains sains et infectés par <i>F. culmorum</i> de blé de printemps	33
<b>Figure 22</b>	Cycle de vie de <i>Fusarium culmorum</i>	33
<b>Figure 23</b>	Schéma de l'interaction mycoparasitaire des hyphes de <i>Trichoderma</i> avec les hyphes d'un pathogène fongique	38
<b>Figure 24</b>	Le modèle « Zigzag » dans les interactions plante/pathogène	45
<b>Figure 25</b>	Modèle de Dodds et Rathjen du système immunitaire des plantes	45
<b>Figure 26</b>	Composition du microbiome de blé	56
<b>Figure 27</b>	Représentation schématique de l'ARNr avec l'emplacement des amorces ITS1 et ITS4	61
<b>Figure 28</b>	Représentation schématique de l'ARNr 16S	61
<b>Figure 29</b>	Croissance de <i>Trichoderma</i> sur milieu sélectif TSM à partir d'une dilution sériée	64
<b>Figure 30</b>	Aspect microscopique du genre <i>Trichoderma</i> sous microscope optique (x400)	64
<b>Figure 31</b>	Profils de l'ADN génomique de quelques isolats fongiques sur gel d'agarose (1%)	66
<b>Figure 32</b>	Profils des produits d'amplification sur gel d'agarose (1,5%)	66
<b>Figure 33</b>	Arbre phylogénétique intégrant tous les isolats bactériens isolés sur les milieux TSA et PDA (analyse basée sur le séquençage de l'ADNr 16S)	71
<b>Figure 34</b>	Arbre phylogénétique de tous les isolats fongiques isolés sur les milieux PDA et TSA (analyse basée sur le séquençage de la région ITS)	71

<b>Figure 35</b>	Diagramme de Venn montrant le nombre et la répartition des espèces bactériennes isolées sur les milieux TSA et PDA selon l'origine des isollements	73
<b>Figure 36</b>	Diagramme de Venn montrant le nombre et la répartition des espèces fongiques isolées sur les milieux PDA et TSA selon l'origine des isollements	73
<b>Figure 37</b>	Arbre phylogénétique des isolats fongiques isolés sur le milieu TSM (analyse basée sur le séquençage de la région ITS)	77
<b>Figure 38</b>	Diagramme de Venn exposant les différentes espèces fongiques isolées à partir de la rhizosphère	77

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Classification phylogénétique du blé	4
<b>Tableau 2</b>	Différences entre un blé tendre et un blé dur	14
<b>Tableau 3</b>	Classification hiérarchique de <i>Fusarium culmorum</i>	24
<b>Tableau 4</b>	Classification des protéines PR	47
<b>Tableau 5</b>	Caractéristiques moléculaires des souches bactériennes isolées	68
<b>Tableau 6</b>	Caractéristiques moléculaires des souches fongiques isolées	70
<b>Tableau 7</b>	Caractéristiques moléculaires des souches fongiques isolées sur milieu sélectif TSM	75
<b>Tableau 8</b>	Genres bactériens isolés dans cette étude ayant des fonctions PGP associés au blé et à d'autres plantes et cités dans la littérature	79
<b>Tableau 9</b>	Genres fongiques isolés dans cette étude ayant des fonctions PGP associés au blé et à d'autres plantes et cités dans la littérature	80

## Résumé

Depuis ces dernières décennies, l'agriculture est soumise à de très fortes pressions pour atteindre des niveaux intensifs de production. La réussite de cet objectif, globalement atteint, est notamment liée à l'utilisation massive de pesticides et d'engrais chimiques. Néanmoins, l'utilisation de ces produits agrochimiques détériore profondément la qualité des sols, ainsi que l'environnement. L'enjeu serait le développement de pratiques agricoles durables qui exploitent les microbiomes naturellement associés aux cultures, notamment en culture céréalière. Cette thèse s'intéresse à éclairer les aspects complexes des communautés microbiennes associées à une variété ancienne de blé, en identifiant chez certains candidats leur potentiel bénéfique sur la croissance et l'immunité innée chez le blé. Deux cent six isolats fongiques et 102 isolats bactériens ont été isolés de la rhizosphère, des racines, et des épis de l'ancienne variété de blé *Florence aurore*. Parmi ces isolats, 6 souches de *Trichoderma* de la rhizosphère et 14 bactéries endophytes des racines de blé ont été sélectionnés afin de caractériser leurs potentiels biofertilisant sur la croissance végétale, et bioprotectant envers *Fusarium culmorum*, un agent pathogène dominant en Tunisie causant des maladies économiquement préjudiciables. Tous ces isolats ont démontré leur efficacité biostimulatrice *in planta* par l'augmentation des biomasses fraîche et sèche, ainsi que la teneur en chlorophylle chez des plants de blé sous conditions contrôlées. Ces aptitudes sont corrélées avec la capacité de ces souches *in vitro* à solubiliser le phosphate et le zinc, à produire des composés indoliques, de l'ammoniac et du cyanure d'hydrogène. Parallèlement, ces souches ont montré une aptitude bioprotectrice en élicitant les défenses végétales de manière systémique chez les jeunes plants de blé de 21 jours. De même, les endophytes bactériens *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus peoriae* et *Pantoea agglomerans* inhibent *in vitro* la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des macroconidies de *F. culmorum*, soit par contact direct, soit en traitant le pathogène avec les fractions intracellulaires purifiées. Ces aptitudes antagonistes seraient expliquées par la production de composés organiques volatils, de substances antifongiques et d'enzymes extracellulaires lytiques telles que l'Amylase, la Cellulase, la Pectinase, la Protéase et la Chitinase. Ces observations offrent des solutions prometteuses afin de dynamiser plus fort encore des cultures céréalières plus productives en Tunisie et respectueuses de l'environnement.

**Mots clés :** *Trichoderma*, Microbiome, Blé, *Fusarium*, Endophytes, Biocontrôle

## Abstract

In recent decades, agriculture has been under strong pressure to achieve intensive levels of production. The success of this goal, largely achieved, is notably linked to the massive use of pesticides and chemical fertilizers. However, the use of these agrochemical products profoundly deteriorates the quality of soils and the environment. The challenge lies in the development of sustainable agricultural practices that harness the naturally associated microbiomes in crops, especially in cereal cultivation. This thesis aims to shed light on the complex aspects of microbial communities associated with an ancient variety of wheat, by identifying their potential beneficial effects on wheat growth and innate immunity. A total of 206 fungal isolates and 102 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere, roots, and ears of the ancient wheat variety *Florence Aurore*. Among these isolates, 6 strains of *Trichoderma* from the rhizosphere and 14 root endophytic bacteria were selected to characterize their biofertilization potential for plant growth and their biocontrol activity against *Fusarium culmorum*, a predominant pathogen in Tunisia causing economically damaging diseases. All these isolates demonstrated their biostimulatory effectiveness *in planta* by increasing fresh and dry biomass as well as chlorophyll content in wheat plants under controlled conditions. These capabilities correlated with the ability of these strains *in vitro* to solubilize phosphate and zinc, produce indolic compounds, ammonia, and hydrogen cyanide. At the same time, these strains showed biocontrol ability by eliciting systemic plant defenses in 21-day-old wheat seedlings. Similarly, the bacterial endophytes *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus peoriae*, and *Pantoea agglomerans* inhibited the mycelial growth, sporulation, and germination of *F. culmorum* macroconidia *in vitro*, either through direct contact or by treating the pathogen with purified intracellular fractions. These antagonistic abilities could be explained by the production of volatile organic compounds, antifungal substances, and extracellular lytic enzymes such as Amylase, Cellulase, Pectinase, Protease, and Chitinase. These observations offer promising solutions to further boost more environmentally friendly and productive cereal crops in Tunisia.

**Key words :** *Trichoderma*, Microbiome, Wheat, *Fusarium*, Endophytes, Biocontrol

## Contexte académique et administratif de ma thèse

Cette thèse a été codirigée par le Dr. Philippe LABEL (INRAE) et le Dr. Hatem CHAAR (Institut National Agronomique de Tunisie). Mon encadrement a été assuré par le Dr. Jean-Stéphane VENISSE (Université Clermont Auvergne). Le financement de ma thèse a été assuré du côté Tunisien par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) ainsi que le Laboratoire des Grandes Cultures (LGC) de l'INRAT, et du côté français par l'Unité Mixte de Recherches de Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en environnement Fluctuant (UMR-PIAF) et par le projet Pack Ambition International (2019) financé par la région Auvergne-Rhône-Alpes.

Ce sujet de recherche est mené en cotutelle entre deux universités accueillant des équipes de recherche du Laboratoire des Grandes Cultures rattaché à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), et de l'UMR INRAE-UCA PIAF. Ces équipes répondent en commun à l'évaluation de nouveaux idéotypes (combinaisons espèces-variétés-pratiques culturales) vis-à-vis de contraintes biotiques et abiotiques variées et en lien avec les changements climatiques en cours, et qui répondent aux enjeux sociaux et politiques d'une production végétale respectueuse de l'environnement (biofertilisation des cultures, biocontrôle des ravageurs, qualité sanitaire et valeur santé pour les consommateurs des produits). A cet effet, ce qui rapproche indéniablement les deux codirections de ma thèse est l'union de multiples compétences (*eg* phytopathologie et agronomie pour les partenaires tunisiens, et phytopathologie et analyses moléculaires pour le partenaire français), avec la volonté commune d'optimiser et de valoriser plus encore l'emploi de formulations phytosanitaires biologiques sur grandes cultures par l'utilisation de micro-organismes vivants (ou de produits dérivés) qui développent des comportements (aptitudes) bénéfiques et antagonistes afin de limiter l'infestation d'agents fongiques phytopathogènes hautement nuisibles, tel *Fusarium culmorum* qui sévit sévèrement sur le blé.



## Le Blé : du mythe à la réalité, une histoire lointaine chargée de croyances

Le blé fut longtemps considéré comme une céréale sacrée. Symbole de bonheur et de prospérité, il est utilisé pour conjurer le mauvais sort. Par exemple, à l'époque de la Rome Antique, le blé représente la fertilité de la terre et l'ouverture de l'âme à la lumière. Ainsi, du blé était lancé sur les jeunes mariés pour s'assurer qu'ils auraient une descendance abondante et florissante.

En d'autres temps et contrées, l'épi de blé était un emblème d'Osiris, un roi mythique de l'Égypte antique, symbolisant ainsi sa mort et sa résurrection. En Égypte, les pharaons étaient enterrés avec du blé en raison de sa symbolique de régénération et de renaissance.



Mesure du blé récolté ; Tombe de Menna (TT 69) à Thèbes (Égypte), XVIII dynastie.  
(<https://mythologica.fr/egypte/civil/agriculture.htm>)

Cette peinture représente une scène de travaux agricoles chez les pharaons. Le grain récolté par les paysans est enregistré par des scripts. C'est le « vizir » qui a la charge de superviser ces opérations au nom du Pharaon. Ce dernier doit s'assurer du bien-être de son peuple et à cet égard, le pain correspondait au salaire de nombreux ouvriers et esclaves.



# **Introduction et enjeu de la thèse**

L'agriculture moderne est confrontée à de nombreux défis, dont la demande croissante de production alimentaire, la diminution des ressources naturelles et l'expansion de nombreuses maladies qui affectent les cultures. Parmi ces maladies, la fusariose des semences, causée par le champignon *Fusarium culmorum*, représente une menace majeure pour la production de blé sur tout le pourtour sud-méditerranéen, et tout particulièrement en Tunisie. La recherche de solutions durables et respectueuses de l'environnement pour lutter contre cette maladie est d'une importance capitale. L'exploration des ressources microbiennes associées aux variétés anciennes de blé pourrait offrir de nouvelles perspectives prometteuses. Ces variétés ont été cultivées pendant des générations et ont pu avoir développé des mécanismes de défense naturels contre les pathogènes. Mais plus important encore, parce que les végétaux modèlent leur microbiote intrinsèque (quel que soit l'organe) et contigu (rhizosphère), nous partons de l'hypothèse que ces variétés ont pu en faire de même. C'est à partir de cette hypothèse que nous avons élaboré nos questions de recherche en ciblant spécifiquement nos efforts sur ces microbiotes.

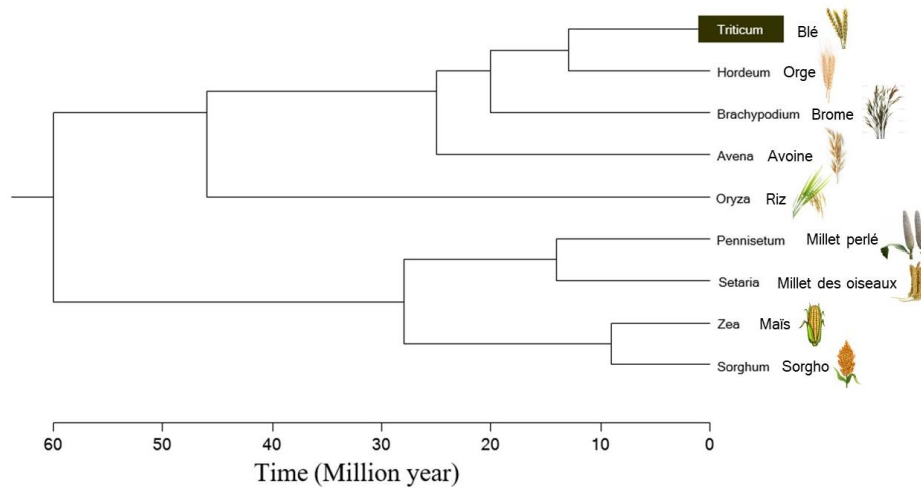
L'enjeu de ma thèse réside dans la recherche de solutions alternatives aux emplois massifs d'intrants chimiques et de phytosanitaires afin de stimuler la croissance du blé moderne et de lutter contre les incidences de fusariose des semences en utilisant des micro-organismes bénéfiques isolés à partir d'une variété ancienne de blé (*Florence Aurore*). Parce qu'il est urgent de répondre aux enjeux d'une agriculture moderne et d'assurer la sécurité alimentaire tout en assurant une gestion d'une production respectueuse de l'environnement et de la santé des producteurs et consommateurs, les résultats issus de nos activités de recherche auraient un impact significatif sur la soutenabilité des pratiques agricoles, en offrant des perspectives prometteuses pour améliorer la résilience des cultures dans un contexte de changements climatiques systémiques avec, comme ligne de mire, la réduction d'utilisation de produits chimiques connus pour être nocifs pour l'environnement.



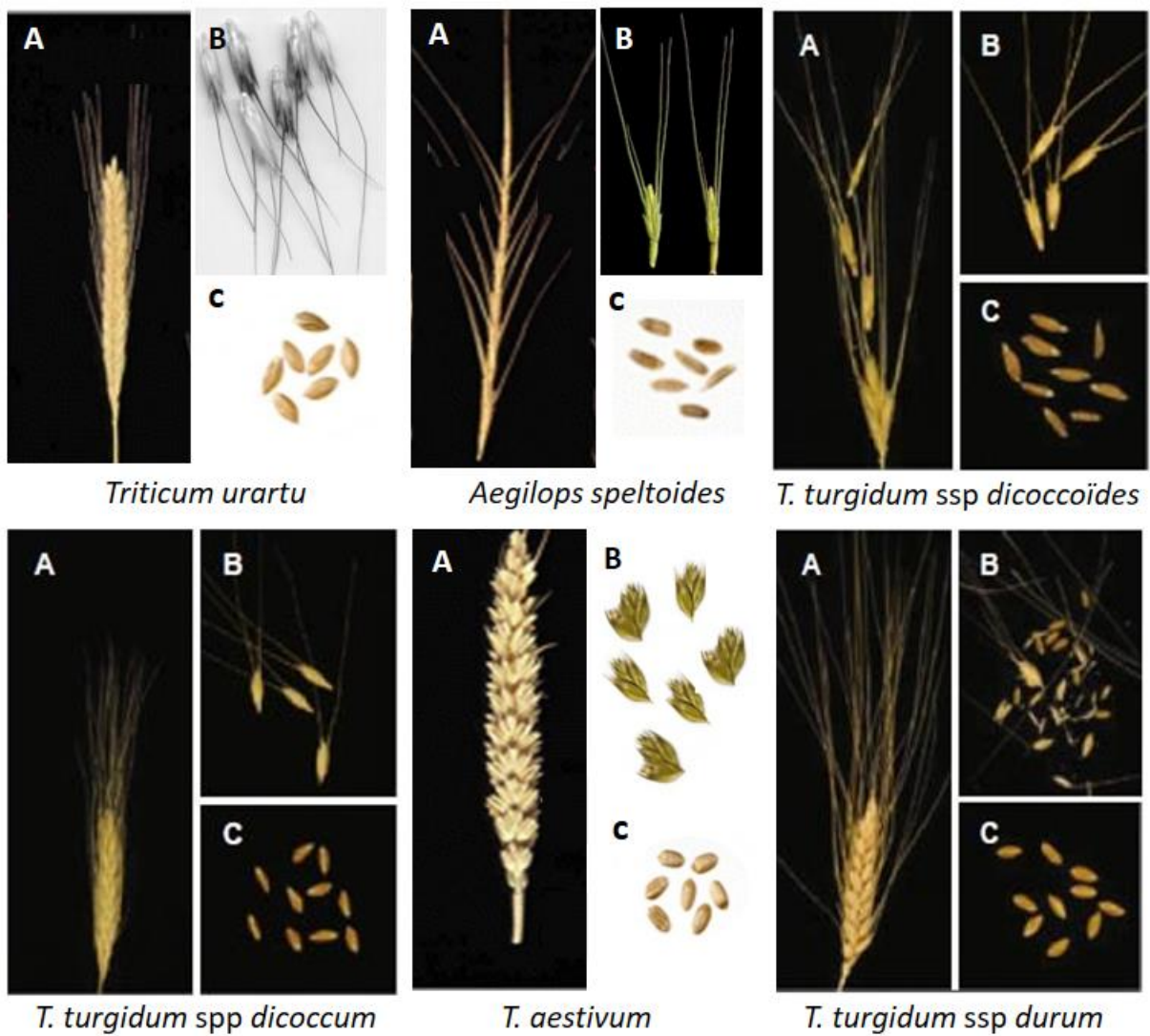
# **Synthèse bibliographique**

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	<i>Commelinidae</i>
Ordre	<i>Poales</i>
Famille	<i>Poaceae</i>
Genre	<i>Triticum</i>

**Tableau 1. Classification phylogénétique du blé (Khalid et al., 2023).**



**Figure 1. Relations phylogénétiques entre le blé et les principaux genres cultivés les plus proches (Bolot et al., 2009). Les dates de divergence de chaque phylum sont en millions d'années. Le blé appartient au genre *Triticum*.**



**Figure 2. Morphologie d'épis (A), épillets (B) et grains (C) du blé dur, blé tendre et des graminées sauvages apparentées (Faris et al., 2014 ; Khalid et al., 2023).**

# I. Le blé

## I.1. Origine géographique, source utile pour l'Humanité et génétique

Le blé est une céréale angiosperme monocotylédone appartenant à la tribu des Triticées, intégrée à la famille des Poacées et au genre *Triticum* (**Tableau 1**). Le terme « céréale » est utilisé pour désigner un groupe de plantes cultivées pour leurs grains comestibles. Les céréales sont une source cruciale de nutriments essentiels dans l'alimentation humaine mondiale, grâce à la présence de glucides complexes, de protéines végétales, de fibres, de vitamines (B, etc.) et de minéraux tels que le fer et le zinc. D'autres espèces sont relativement proches du blé au sein de la même tribu des Triticées, comme l'orge (*Hordeum*) et le seigle (*Secale*).

La famille des Poacées a un intérêt économique majeur car elle regroupe d'autres céréales comme le sorgho (*Sorghum*), le maïs (*Zea*) et le riz (*Oryza*), ainsi que des graminées fourragères utilisées dans l'alimentation du bétail comme le ray-grass (*Lolium*), le dactyle (*Dactylis*) et la fétuque (*Festuca*) (**Figure 1**).

Les premières cultures de blé sont apparues il y a 10 000 ans, au niveau d'une région du proche orient actuel qui s'étend de la mer Morte au golfe Persique en passant par le sud de la Turquie, le nord de l'Iraq et l'Iran occidental. Son aire d'origine est située dans le croissant fertile, une région géographique du proche orient localisée entre la côte méditerranéenne à l'ouest et la plaine du Tigre et de l'Euphrate à l'est. C'est une plante annuelle cultivée pour ses grains comestibles riches surtout en amidon et en protéines (Smith et Wayne, 1995).

L'ensemencement, la culture et la récolte répétées des variétés sauvages ont conduit à la domestication du blé entre 10000 et 15000 avant JC. Cette domestication a modifié la forme des plantes de blé avec plus de grains, des épillets restant sur la tige jusqu'à la récolte et des épis rigides les rendant plus compactes et plus faciles à cultiver en agriculture (Dubcovsky et al., 1997).

La première transition du blé a été caractérisée par l'apparition d'un rachis solide, d'où le passage du blé dur sauvage (amidonnier sauvage) *Triticum turgidum* ssp *dicoccoïdes* à *Triticum turgidum* spp *dicoccum* (amidonnier cultivé). Ce dernier correspondrait à la première forme cultivée, se caractérisant par des grains à maturité qui restent fixés sur les plantes pour une récolte facile (**Figure 2**).

La deuxième transition a été marquée par le remplacement de l'amidonnier cultivé par une nouvelle forme de blé dur : *Triticum turgidum* ssp *durum* et l'apparition des grains nus qui facilitent le battage. La dernière transition qui a eu lieu dans les années 1960, c'est à dire lors de la révolution verte, a assuré le passage des « populations de pays », qui sont en fait un mélange de différents génotypes, aux variétés « élites » avec un rendement plus fort, une taille réduite et une forte capacité à absorber beaucoup d'azote (Morgane, 2019). Des programmes de sélection et de création variétales par croisement ont été initiés au cours du 20<sup>ème</sup> siècle pour obtenir des « lignées pures » et semi-naines, afin de limiter la verse et donc augmenter le rendement. Ces variétés « élites » font l'objet d'amélioration en continu pour avoir les meilleures caractéristiques agronomiques en termes de

productivité, de valorisation de l'azote et surtout de résistance à certaines maladies (fusariose, rouille, oïdium et septoriose).

Cette course à la sélection variétale a ainsi engendré une perte inévitable de la diversité génétique des nouvelles variétés cultivées par rapport aux variétés sauvages dont elles sont issues (Buckler et al., 2001 ; Thuillet et al., 2005 ; Haudry et al., 2007).

Génétiquement, toutes les espèces de *Triticum* sont constituées de quatre génomes de base : A, B, D et G, avec un nombre basique de chromosome de  $x=7$  (Haider, 2012). Les espèces sauvages comme *Triticum monococcum* et *Triticum tauschii* sont diploïdes ( $2n=2x=14$ ) avec les désignations du génome AA et DD respectivement, ou tétraploïdes ( $2n=4x=28$ ) portant deux génomes soit AABB pour l'espèce *Triticum turgidum* et AAGG pour l'espèce *Triticum timopheevii* (Waines et Barnhart, 1992).

Le blé moderne a été créé à partir de plusieurs espèces dont les principales sont l'espèce diploïde *Triticum urartu* et l'espèce sauvage *Aegilops speltaoides*. Ces deux espèces se sont croisées naturellement pour donner naissance à une nouvelle espèce intermédiaire appelée *Triticum turgidum* qui, par la suite, s'est croisée avec une autre espèce sauvage de blé (*Aegilops tauschii*) pour créer finalement une nouvelle espèce hexaploïde « *Triticum aestivum* » ou blé tendre ; son génome est de type AABBDD et est composé de 42 chromosomes ( $2n=6x=42$ ) (Haider, 2012).

Le blé dur ou *Triticum durum* est un tétraploïde de génome AABB. Il est également le fruit d'une hybridation naturelle entre plusieurs espèces parentes, dont *Triticum urartu* et *Aegilops speltaoides*, impliquées dans la formation du blé tendre et celle de l'espèce sauvage *Triticum turgidum dicoccoïdes* (**Figure 3**) (Feldman et Sears, 1981).

## **I.2. Biologie et Cycle de développement du blé**

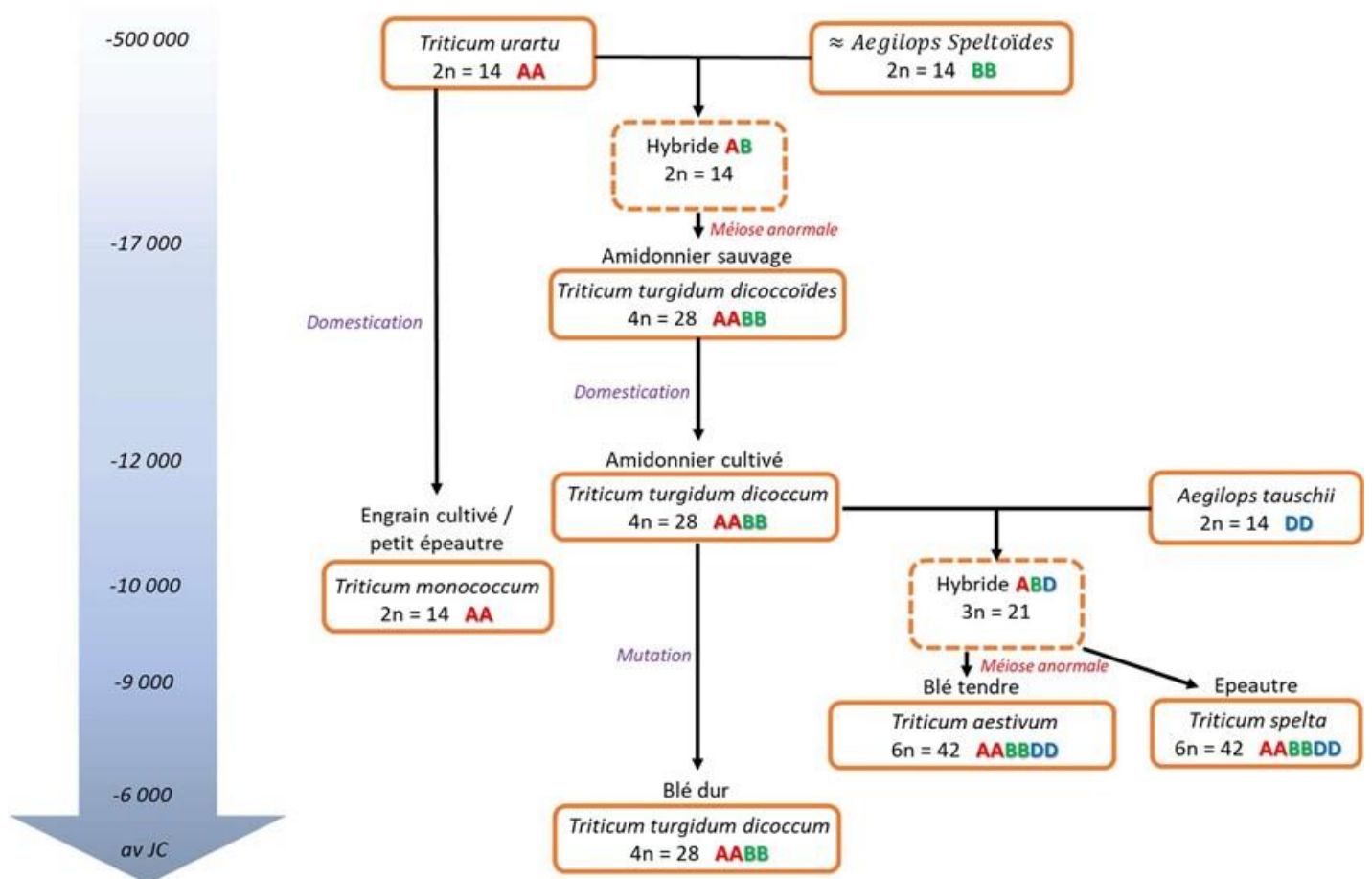
### **I.2.1. Appareil végétatif et reproducteur**

Le blé est une plante herbacée annuelle qui mesure entre 60 cm et 120 cm de haut. Son appareil végétatif comprend un appareil racinaire et un appareil aérien.

L'appareil racinaire est de type fasciculé, avec deux systèmes : un système primaire composé de racines séminales d'origine embryonnaire et formées par une racine principale. Cette racine principale résulte de l'allongement de la radicule, deux paires de racines latérales et d'une racine épiblastique. Ce système fonctionne de la germination au tallage (Grignac, 1965). Le second système est formé de racines adventives, ou racines de tallage, qui se substituent au système séminal (Hazmoune, 1994 ; Hamadache, 2001).

L'appareil aérien est formé d'un certain nombre d'unités ou talles. Chaque talle est formée de tiges et de feuilles qui partent d'une zone à la base de la plante appelée plateau de tallage. Le chaume de blé est représenté par une tige cylindrique formée de nœuds et d'entre nœuds. Chaque nœud est le point d'attache d'une feuille. La feuille de blé est composée d'une partie inférieure entourant la jeune pousse (gaine) et une partie supérieure ou limbe.





**Figure 3. Phylogénie et chronologie de la domestication du blé** (Ducasse, 2021).

Détails des croisements entre les différents espèces de blé sauvages et hybrides avec la composition de leurs génomes (AA, AB, BB, AABB, DD et ABD), et aboutissant à la création du blé tendre hexaploïde (AABBDD) et du blé dur (AABB).

L'appareil reproducteur du blé correspond à l'épi. Il est formé de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis. Chaque épillet est constitué de 3 à 4 fleurs hermaphrodites, ce qui fait du blé une plante autogame. Chaque fleur est enfermée entre deux glumelles, portée par un court pédicelle. Elle se compose de trois étamines qui se terminent chacune par une anthère en X, un pistil composé d'un seul ovaire, et de deux styles qui se terminent chacun par un stigmate plumeux (Ahmadi et al., 2002).

La fécondation se déroule à l'intérieur des glumelles avant l'apparition des étamines à l'extérieur, ce qui assure une pureté variétale au cours des générations. Le fruit est représenté par un grain indéhiscent appelé caryopse (Soltner, 2012).

### **I.2.2. Cycle de développement du blé**

Le cycle de développement du blé comprend trois étapes majeures : une période végétative, une période reproductrice et une période de maturation. Plusieurs échelles de notation du blé ont été développées afin de caractériser son cycle de développement (Alley et al., 1999). Par exemple, l'échelle de Feekes permet de définir le stade de croissance et de développement des céréales, et est basée sur la morphologie de la tige, des feuilles et des épis. Il existe aussi l'échelle de Zadoks qui est une échelle de développement des stades phénologiques (phases de développement saisonniers) des céréales. Cette échelle suit la croissance de la plante sur 10 principaux stades, sous divisés en stades de croissance secondaire, pour produire une échelle à deux chiffres (**Figure 4**).

#### **I.2.2.1. La période végétative**

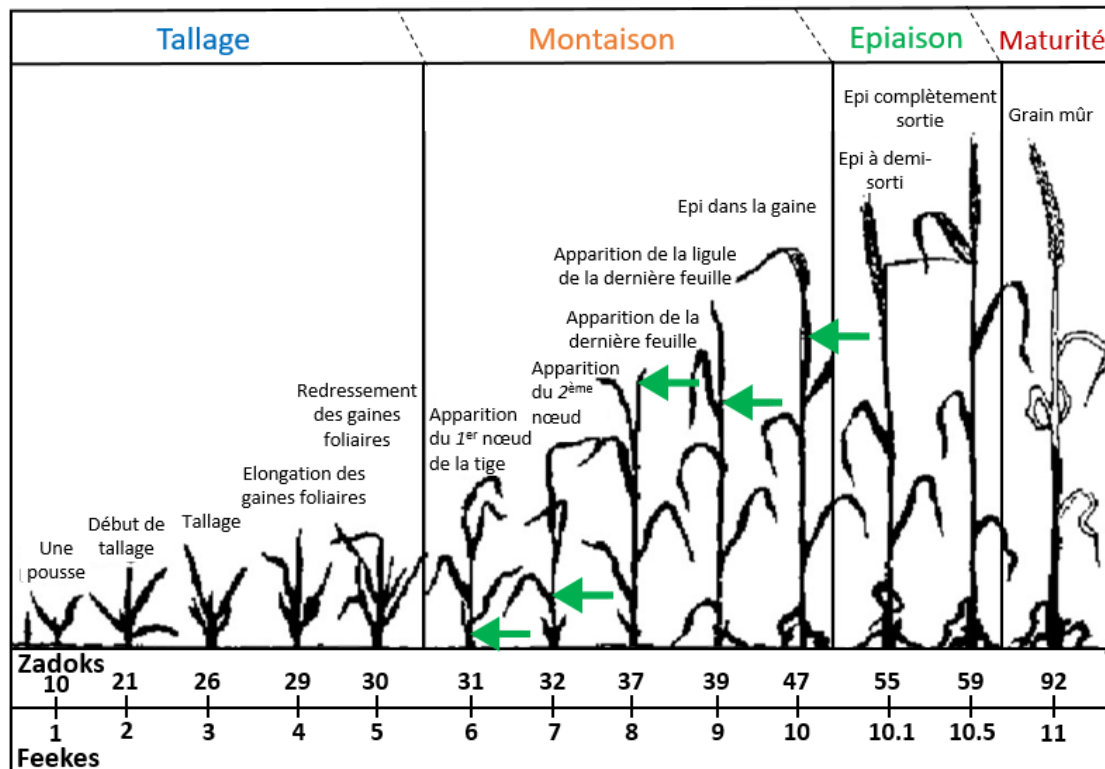
La période végétative correspond à la production de racines, tiges et feuilles. Elle se caractérise par un développement strictement herbacé et s'étend du semis jusqu'à la fin du tallage.

##### ***Phase germination-levée***

Après imbibition de la semence, les enzymes se réactivent pour dégrader les réserves nécessaires au développement de l'embryon. La radicule se dégage alors, donnant naissance à des racines séminales. Ensuite, le coléoptile se développe et perce le sol en protégeant la sortie de la première feuille. Durant cette phase, la plante est alimentée uniquement par son système racinaire primaire et ses réserves. Des facteurs édaphiques comme la chaleur, l'aération et l'humidité, ainsi que des caractéristiques propres à la graine comme la faculté germinative et la quantité de réserves, jouent un rôle déterminant et interviennent dans la levée de dormance des graines et leur germination (Karou et al., 1998).

##### ***Phase levée-Tallage***

La production de brins ou talles s'amorce à l'issue du développement de la quatrième feuille suivant un rythme régulier égal à celui de l'émission des feuilles pour former un plateau de tallage situé juste au niveau du sol. Chaque talle est formée d'un système racinaire, d'un ensemble d'unités morphologiques appelé photomètre, d'un pédoncule et d'un épi. La première talle émise, encore appelée brin maître, est formée à partir du bourgeon apical alors que les talles secondaires sont issues de bourgeons



**Figure 4. Stades de croissance du blé selon les échelles de Zadoks et Feekes** (Alley et al., 1999). Cycle de développement du blé divisé en trois étapes majeures : une période végétative (tallage), une période reproductrice (montaison et épiaison) suivie d'une période de maturation, définies par l'échelle de Feekes (basée sur la morphologie) et l'échelle de Zadoks (basée sur les stades phénologiques) sous forme de chiffres montrant les stades principaux et secondaires de la croissance du blé.

axillaires situés au niveau du plateau de tallage ; la talle issue du bourgeon du coléoptile n'est pas considérée comme une talle secondaire et demeure généralement plus chétive. Les talles secondaires peuvent émettre des talles tertiaires en fonction de la variété, du climat, de l'alimentation et de la densité des semis (Belaid, 1986 ; Gate, 1995). La fin de cette phase de tallage marque la fin de la période végétative et le début de l'élongation des entre-nœuds au cours de la phase reproductive stimulée par la photopériode et la vernalisation (Gate, 1995).

### ***Différences entre le blé d'hiver et le blé de printemps***

La différence majeure entre les deux classes de blé, c'est-à-dire les blés d'hiver et les blés de printemps, est marquée par l'initiation de la transition de la phase végétative vers la phase reproductive. Le blé d'hiver a besoin d'une période froide et de jours courts (période de vernalisation) pour initier la floraison d'où son semis en automne pour fleurir au printemps. Quant au blé de printemps, ce besoin de froid n'existe pas et la transition florale est initiée après la mise en place d'un nombre de feuilles qui est déterminé et modulé par la photopériode.

#### **1.2.2.2. La période reproductrice**

##### ***La montaison - gonflement***

La montaison est caractérisée par l'allongement des entre-nœuds et la différenciation des pièces florales. Cette phase est repérable dès que l'ébauche de l'épi du brin maître atteint 1 cm de hauteur à partir du plateau de tallage (Gate, 1995). A la fin de ce stade, l'épi prend sa forme définitive à l'intérieur de la gaine de la feuille étendard, et les grains de blé commencent à se développer (gonflement). Pendant cette phase de croissance qui est considérée critique, les besoins en éléments nutritifs (notamment en azote) sont accrus et tout stress thermique ou hydrique réduit le nombre d'épis montant par unité de surface (Baldy, 1984).

##### ***L'épiaison-floraison***

L'épiaison est atteinte quand 50% des épis sont à moitié sortis de la gaine de la dernière feuille. Elle est marquée par la méiose pollinique et l'éclatement de la gaine dû à l'émergence de l'épi. Les épis dégainés fleurissent (l'anthèse), et la fécondation a alors lieu (Bahlouli et al., 2005). La fertilité des épis à ce stade peut être fortement influencée par les basses températures (Abbassenne et al., 1998). L'excès de température au moment de la fécondation peut pénaliser le nombre de grains par épi.

#### **1.2.2.3. La période de formation et de maturation du grain**

##### ***Remplissage du grain***

Au cours de cette phase il y a une modification du fonctionnement de la plante qui se traduit par une réorientation de la biomasse produite vers le remplissage des grains. Les cellules des grains en formation se multiplient rapidement, puis elles augmentent rapidement de volume et de masse fraîche.

Au début, les besoins des grains sont inférieurs à ce que fournit la photosynthèse des parties aériennes et de la feuille étendard. Ces besoins augmentent alors progressivement, et le poids des grains dans l'épi s'élève. A la fin de cette phase, le grain atteint sa taille définitive avec 40 à 50% des réserves mais il est encore vert et mou. Ce stade est appelé « grain laiteux » du fait que les grains contiennent 80% d'eau et libèrent un liquide blanchâtre en les écrasant. Un stress thermique au début de cette phase peut affecter la multiplication cellulaire dans les grains, réduisant ainsi leur taille, ce qui pénalise le poids de mille grains (PMG) final. Si ce stress apparaît tardivement lors de la phase de remobilisation, il touche la migration des sucres vers les grains et peut induire un échaudage du grain (Wardlaw, 2002).

Le remplissage des grains se poursuit avec le transfert progressif de sucres depuis les tiges et les feuilles qui commencent alors à jaunir, ainsi que les dernières feuilles encore vertes dans lesquelles une faible activité photosynthétique persiste. Le gain de masse reste linéaire jusqu'à l'arrêt de ce transfert, et la largeur de la graine se fixe. Quant à la masse sèche, elle augmente, donnant une apparence pâteuse qui définit ce stade « grain pâteux ». Durant la phase « grain laiteux » au « grain pâteux », la quantité d'eau contenue dans le grain est stable, cependant, il corrèle avec une très haute sensibilité de la plante au stress hydrique et thermique : c'est le pallier hydrique (Schnyder et Baum, 1992). La phase de remplissage se termine par l'arrêt des transferts de réserve entre la plante-mère et le grain pour atteindre la maturité physiologique. A ce stade, les températures élevées n'affectent plus le PMG. Au contraire, elles favorisent la polymérisation des protéines améliorant ainsi la qualité technologique, c'est-à-dire les caractéristiques physiques, chimiques et fonctionnelles du grain.

### ***Maturation du grain***

Après l'arrêt de croissance, les activités enzymatiques cessent. Les graines rentrent progressivement dans un état de dormance et de dessiccation. La teneur en eau baisse et le grain passe de 45% d'humidité à 20% (stade rayable à l'ongle) puis à 15% (stade cassant sous la dent) pour atteindre son poids sec final (<5%) (Wardlaw, 2002). La transition est relativement progressive d'une phase à une autre avec un décalage de quelques jours entre épis et entre grains d'un même épi.

### ***Structure et composition du grain de blé***

Le grain de blé ou caryopse est un fruit sec indéhiscant dont le tégument est soudé à l'enveloppe (péricarpe), trois grandes parties forment le grain : l'embryon, l'albumen et les enveloppes avec une brosse à l'extrémité opposée de l'embryon et un sillon en phase ventrale (**Figure 5**).

#### ***L'embryon***

Il est issu de la fusion entre gamètes mâles et femelles. L'embryon est entouré par une structure en forme de croissant (le scutellum) ayant un rôle clé dans l'absorption des nutriments de la graine. L'embryon est formé d'un axe embryonnaire, qui est la partie centrale de l'embryon elle-même composée de plusieurs structures dont l'hypocotyle et la partie supérieure de la racine. Vers le bas de cet axe, se trouve la radicule qui est la première racine émergeant de la graine et qui sera responsable de l'ancrage de la plante

dans le sol. Cette racine est entourée par une gaine protectrice appelée coléorhize. Vers le haut de ce même axe, se trouve la gemmule. Cette structure est responsable de la formation de la première feuille, et est coiffée par le coléoptile qui est une structure protectrice en forme de tube aidant la pousse émergente à émerger de la graine et à se frayer un chemin à travers le sol.

#### *L'albumen*

C'est la partie du grain qui sert de réserve pour l'embryon, en lui fournissant notamment la source d'acides aminés nécessaires à la germination. Il représente de 80 à 85% du poids du grain et il contient 90% des protéines et la totalité de l'amidon du grain. Cette composition définit les propriétés physico-chimiques de la pâte à l'échelle industrielle. L'albumen est formé d'une couche à aleurone à parois épaisses, et est très riche en vitamines et en minéraux. A ce titre, il présente un rôle protecteur et nourricier à la fois. Cette couche entoure l'albumen amylicé qui est constitué essentiellement de granules d'amidon enchâssés dans une matrice protéique.

#### *Les enveloppes*

La graine de blé est entourée de couches protectrices qui ont pour fonction de protéger l'embryon et l'albumen contre les dommages physiques, chimiques et biologiques (**Figure 5**). Ces couches sont : le péricarpe qui permet d'empêcher les pertes d'eau au cours du développement du grain mais qui n'empêche pas sa pénétration (Evers et al., 1999), la testa ou tégument de la graine est composée de cellules mortes formant une barrière protectrice autour de l'embryon, puis la bande hyaline, qui est une couche très hydrophobe, jouant un rôle important dans la circulation de l'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la graine.

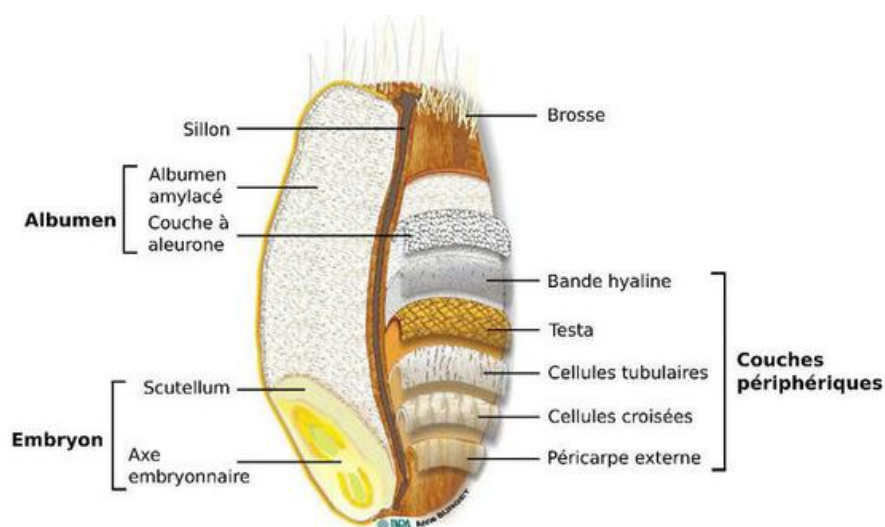
#### ***Différences entre blé dur et blé tendre***

Le blé dur se différencie principalement du blé tendre par son grain à albumen vitreux et sa plus haute teneur en protéines, sa sensibilité au froid et sa résistance à la sécheresse. D'autres différences comme la forme, l'aspect de la plante et l'utilisation sont illustrées dans le **Tableau 2**.

### **I.3. Exigences du blé**

#### **I.3.1. Sol**

Pour produire des rendements optimaux, il est préférable de cultiver le blé dans un sol ayant un pH neutre. Les sols argileux ou limoneux sont les plus adéquats car ils présentent une bonne capacité de rétention d'eau et de nutriments, alors que les sols sablonneux trop drainant ou les sols tourbeux à fortes teneurs en minéraux sont à éviter (Mojid et al., 2020). La texture du sol a une grande influence sur la croissance des plantes (hauteur, surface foliaire, biomasse végétale, nombre et qualité des grains), et doit être suffisamment aérée pour assurer la circulation de l'eau et de l'air, tout en étant relativement stable pour éviter l'érosion.



**Figure 5. Schéma de la structure anatomique d'un grain de blé (coupe longitudinale)** (Surget et Barron, 2005). Trois principales zones le composent : les enveloppes (au niveau des couches périphériques), l'albumen et l'embryon.

Caractère	Blé tendre	Blé dur
<b>Aspect génétique</b>	3 génome A, B et D $2n = 42 = 3x (2x7)$	2 génomes A et B $2n = 28 = 2x (2x7)$
<b>Prédominance</b>	De l'amidon	Des protéines
<b>Aspect de la plante</b>	Feuilles très étroites Maturation rapide	Feuilles larges Maturation très longue Moisson tardive exigeante du point de vue sol et climat
<b>Forme</b>	Texture opaque Structure de l'amande farineuse	Texture vitreuse
<b>Utilisation</b>	Obtention de la farine utilisée dans la fabrication du pain et des biscuits	Obtention de la semoule à partir de laquelle on fabrique de la galette, du couscous et des pâtes alimentaires

**Tableau 2. Différences entre un blé tendre et un blé dur** (Aidani, 2015). Le blé tendre et le blé dur se différencient au niveau du génome, l'aspect de la plante, la forme et la composition de la graine, et leur utilisation dans l'alimentation humaine.

### **I.3.2. Température**

Les facteurs climatiques ont une grande influence sur les différentes phases de la croissance du blé (Clement et Prats, 1970). La notion de zéro de végétation et de germination définit la température à partir de laquelle le blé germe et pousse. Elle est de 0°C avec un optimum situé entre 20 et 22°C. Les températures élevées, situées entre 25-32°C, accélèrent la levée et provoquent parfois un déséquilibre entre la partie aérienne et la partie souterraine, défavorisant l'allongement racinaire (Baldy, 1993).

Les sommes de température selon les stades de croissance sont les suivantes (Mekhlouf et al., 2001) :

- semis - stade levée : 120 degrés jours de croissance (DJ), la température de base étant 0°C
- semis - stade tallage : 450 DJ
- semis - stade plein tallage : 500 DJ
- semis - stade épi 1 cm : 600 DJ

La température journalière intervient dans le cycle de développement de blé de plusieurs manières. Elle détermine la vitesse de germination et le développement de la jeune plante, et elle intervient dans la synthèse de la quantité de matière sèche au moment de la montaison. Pendant la phase végétative, le blé est moins sensible à la température que pendant sa phase reproductive. Des températures basses au moment de la floraison provoquent une coulure des fleurs, affectant le rendement de la culture, alors que des températures hautes lors du remplissage des grains peuvent conduire à l'échaudage, affectant ainsi le rendement et la qualité des grains (Mekhlouf et al., 2001).

### **I.3.3. Eau**

L'eau a une grande importance dans la croissance. Constituant cellulaire primordial, elle joue le rôle de solvant et de véhicule pour les éléments minéraux solubles de la sève brute (Soltner, 1990).

Les besoins en eau varient en fonction des conditions climatiques, ainsi que du stade de développement de la culture et de la variété de blé. Pour atteindre la maturité physiologique et un rendement potentiel, le blé a besoin en moyenne d'environ 350 à 600 mm d'eau sur l'ensemble de la surface de culture. Pendant la germination, une humidité suffisante est nécessaire pour la germination du grain, ainsi qu'environ 20 à 25 mm d'eau par semaine pour maintenir une croissance saine. Au stade du remplissage du grain, ces besoins sont plus importants et nécessitent 40 à 50 mm d'eau par semaine. Pendant la période de maturation, et pour assurer une maturation uniforme du grain, le blé a besoin d'une quantité réduite d'eau, généralement autour de 20 à 30 mm d'eau par semaine. Un coefficient de transpiration du blé (Kc) a été défini par Clement et Prats (1970) et permet d'estimer la quantité d'eau évaporée par les cultures de blé de la surface du sol pendant leur cycle de croissance. Ce coefficient est utilisé en agriculture pour calculer les besoins en eau des cultures, et ainsi optimiser et/ou planifier l'irrigation.

### **I.3.4. Fertilisation**

Pour avoir une qualité supérieure des blés produits, la maîtrise de la fertilisation est essentielle. Cette fertilisation fournit au blé des éléments nutritifs avec des quantités appropriées pour un bon développement et des rendements élevés et réguliers.

L'emploi d'une méthode de fertilisation est dépendant de plusieurs paramètres comme la variété choisie, le rendement attendu, les caractéristiques physico-chimiques du sol, les nutriments du sol, la date des semis et le volume d'irrigation et de précipitations.



Le blé a besoin de nutriments pour une bonne croissance et un rendement satisfaisant. Parmi les principaux, nous pouvons citer l'azote (N), le potassium (K), le phosphore (P) (Phosphate =  $\text{PO}_4^{3-}$ ), le soufre (S), le magnésium (Mg), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le bore (B), le cuivre (Cu), et le calcium (Ca).

Ces besoins sont dépendants du stade de croissance et sont répartis comme suit :

<b>Stade de croissance</b>	<b>Nutriments</b>
Levée-Implantation	N – $\text{PO}_4^{3-}$
Tallage	N – Mg
Élongation de la tige	N – $\text{PO}_4^{3-}$ – K – S – Mg – Zn
Feuille drapeau – Pollinisation – Remplissage des grains	N – $\text{PO}_4^{3-}$ – Mg – B

### *L'azote*

L'azote est l'un des principaux facteurs limitant le rendement. Il est essentiel pour l'élaboration des protéines et l'augmentation de la masse végétative, d'où la nécessité qu'il soit fourni au fur et à mesure des besoins de la plante. Pour produire 1 tonne de grains de blé par hectare, 25kg d'azote seront nécessaires. Une répartition de 3 doses pendant la saison de croissance est plus efficace que d'effectuer toute la fertilisation en une seule fois. Un premier apport de 35 à 50% de la quantité totale d'azote doit être apporté juste avant ou pendant le semis des graines, suivi d'un deuxième et d'un troisième apport pendant la phase d'initiation des racines adventives, de tallage ou d'élongation de la tige. Une carence en azote est responsable d'un retard de croissance, du nanisme des plantes avec des feuilles petites en raison de la perturbation de la synthèse de la chlorophylle. *A contrario*, un excès d'azote ralentit le développement des tissus, un fonctionnement excessif des méristèmes et une lignification réduite (Mazliak, 1998).

### *Le phosphore*

Cet élément est un constituant de certains éléments essentiels à la vie cellulaire comme les acides nucléiques et des phospholipides. De plus, il joue un rôle comme cofacteur et transporteur d'énergie, et il intègre de nombreuses réactions métaboliques comme la photosynthèse (Heller et al., 1998).

L'apport total en phosphore est effectué le moment du semis sous forme de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Il peut être mélangé avec les semis car les engrais phosphatés n'ont pas d'effet négatif sur la germination. Pour obtenir un rendement maximal, une dose d'environ 20-40 kg de phosphate par hectare doit être apportée. Un excès d'engrais phosphaté, en particulier en hiver, peut entraîner une baisse de la teneur en protéine et de biodisponibilité du zinc, ainsi qu'une sensibilité au gel (Gusta et al., 1999 ; Zhang et al., 2017). Par contre, une carence en phosphore est à l'origine de plusieurs maladies physiologiques telles que le nanisme et des malformations d'organes (Mazliak, 1998).

### *Le potassium*

Le potassium est nécessaire au début de croissance, pendant l'élongation de la tige et la floraison. Par ailleurs, il favorise le remplissage des grains. Il intervient dans l'activation de certaines kinases, la synthèse de protéines et la synthèse de polysaccharides.

L'abondance et la mobilité du potassium est nécessaire pour l'équilibre acido-basique

cellulaire, ainsi que pour assurer une pression osmotique et donc une turgescence vacuolaire optimale.

La fertilisation potassique est appliquée sous forme de  $K_2O$ . Elle est opérée en cas de carence potassique dans sol et après analyse du sol. L'application du potassium ne peut pas se faire en fumure de fond à cause du risque de brûlure des semences, mais elle se fait en surface avant le semis ou par fertilisation foliaire au printemps (Reid, 2003). Une carence en potassium se traduit par des chloroses et nécroses aux bords et extrémités des feuilles, et un déficit de l'activité photosynthétique.

### *Le soufre*

Le soufre est un élément doublement essentiel pour le blé. Il est important pour la teneur en acides aminés sulfurés nécessaire à la synthèse des protéines. De même, il joue aussi un rôle essentiel dans la qualité des grains de blé destiné à la production de farine panifiable. En effet, le soufre est nécessaire à la production de deux protéines clés dans la graine de blé : les gliadine et gluténine qui, ensemble, forment le gluten. Ce gluten confère des propriétés de viscoélasticité. D'autre part, le soufre permet une assimilation plus efficace de l'azote, d'où la plupart des engrais azotés comprennent une quantité de soufre suffisante (Hřivna et al., 2015). Le soufre peut être apporté sous forme de  $SO_3$  ou de  $SO_2^{4-}$ , avec une possibilité d'application foliaire pour le  $MnSO_4$ . Il doit être apporté sous forme de petites doses, en plusieurs apports, et distribué sur les différentes phases de croissance et en association avec des engrais azotés du fait de son interaction positive avec l'azote et qu'il est très peu mobile. Afin d'ajuster les quantités de soufre apportées, il est recommandé de faire des analyses du sol et de tissus. Une grande partie des sols est carencée en soufre à cause du lessivage provoqué par des irrigations prolongées et massives, ainsi que les faibles apports d'engrais soufrés. Les carences en soufre retardent la croissance et provoquent des chloroses vives de couleur jaune-vert sur les feuilles jeunes, et réduisent significativement le nombre et la taille des grains.

## **I.4. Domestication et association microbienne**

### **I.4.1 Généralités**

Pendant la révolution verte de 1943, le blé a subi des modifications génétiques significatives, dont l'introduction de gènes de nanismes (*rht*) pour donner naissance à du blé moderne à plus haut rendement en présence d'une quantité élevée de fertilisants sans que les plants soient touchés par la verse (Hedden, 2003).

Par opposition, un blé ancien est un blé consommé avant la seconde guerre mondiale, et qui a été sélectionné et multiplié avec des méthodes non transgressives de la cellule végétale et à la portée du cultivateur final. Ce blé ancien présente une grande diversité génétique, source de biodiversité et de résistance aux maladies et plus riche en éléments nutritifs (Yvon et Brocard, 2021). Par conséquent, les divergences phénotypique et génétique des variétés modernes par rapport aux variétés anciennes de blé ont entraîné des modifications dans l'architecture et la physiologie des racines. Ces sélections ont pour corollaire d'affecter les communautés microbiennes (Bertin et al., 2003 ; Graaff et al., 2013).

Il est admis que les programmes de sélection variétale affecteraient significativement la capacité des variétés modernes à sélectionner et à maintenir une communauté bactérienne complexe au niveau de la rhizosphère (Yvan et al., 2019).

Cette situation influencerait négativement l'interaction avec les rhizobactéries promotrices de croissance des plantes (PGPR) (Kavamura et al., 2020 ; Valente et al., 2019). Le blé sauvage, avec sa communauté d'endophytes fongiques riche et diversifiée, représenterait un réservoir plus riche et diversifié d'endophytes potentiellement bénéfiques par rapport au blé cultivé (Sun et al., 2020). Les conséquences sur le microbiome associé ne sont pas encore entièrement comprises, mais il est établi que la domestication du blé a perturbé les processus sélectifs dans l'assemblage du microbiome apparenté à cette espèce (Hassani et al., 2020).

#### **1.4.2. Importance des micro-organismes du sol**

Les micro-organismes jouent un rôle primordial dans la décomposition, le recyclage et le transfert des nutriments dans le sol. A cet égard, ils ont un impact direct sur la croissance des plantes.

Au niveau de la rhizosphère, qui correspond à la partie du sol pénétrée par les racines des plantes en interaction intime avec les micro-organismes associés, la plante a mis en place des mécanismes moléculaires riches et complexes (*ie* régulation, transport, métabolisation, etc.) pour mobiliser l'eau et les nutriments minéraux. En réponse, elle peut libérer jusqu'à 30% de ses produits de photosynthèse sous forme d'exsudats racinaires qui sont riches en sucres, acides aminés, acides organiques, enzymes et régulateurs de croissance. Ce pool moléculaire remarquablement diversifié est le terreau qui initie et structure les interactions des plantes avec les micro-organismes bénéfiques (Trevors et al., 1997).

Par ailleurs, ces micro-organismes jouent un rôle crucial dans le maintien d'une performance physiologie générale optimale de la plante (*ie* croissance et système immunitaire inné), dont la « bonne santé » permet une excellente adaptation de l'organisme dans son environnement.

Mais plus globalement, ces micro-organismes bénéfiques (mais également neutres, commensaux, etc.) procurent ainsi de nombreux avantages pour l'environnement en général, par leur contribution directe sur les plantes et en influant sur la fertilité et la stabilisation du sol.

### **1.5. Production et Importance économique du blé**

#### **1.5.1. A l'échelle mondiale**

La production du blé dans le monde est de l'ordre de 761 millions de tonnes (Mt) en 2020 contre seulement 100 Mt en 1910. Le blé tendre est le plus récolté. De plus, 58% de cette récolte sont destinés à la consommation humaine, 34% à l'alimentation animale et 8% aux usages industriels. Les principaux pays producteurs sont la Chine, l'Inde, la Russie, les États-Unis, le Canada et la France.

Le blé est cultivé sur plus de terres que toute autre culture vivrière au monde. Les superficies ont peu fluctué au cours des 20 dernières années, avec 219 006 893 hectares (ha) en 2020 contre 214 932 133 hectares en 2000. La demande de blé est en constante augmentation à cause de la croissance démographique, mais aussi par le développement de l'industrie alimentaire et de l'urbanisation rapide qui ont entraîné une augmentation de la demande des produits alimentaires transformés comme le pain, les pâtes, les céréales et les biscuits, qui sont souvent fabriqués à partir du blé. Bien que les superficies cultivées n'aient pas beaucoup augmenté pour gérer cette demande en augmentation, c'est principalement grâce à la progression des rendements que la production mondiale a continué d'augmenter (Day et al., 2006 ; Shewry et Hey, 2015).

Le blé est une culture dont l'importance est souvent sous-estimée malgré sa présence dans notre vie quotidienne. Bien que le blé soit facilement accessible dans les pays développés, il est considéré comme un bien précieux dans les pays qui souffrent d'un déficit structurel à son égard. Il joue un rôle substantiel dans le développement des sociétés et l'organisation des relations de pouvoir depuis l'Antiquité. La demande pour ce produit vital est mondialisée et amplifiée en raison de la croissance démographique. La culture de blé est surtout localisée dans des territoires bénéficiant d'une géographie généreuse en eau, en sols fertiles et en climat tempéré. Très peu de pays possèdent ces atouts, et encore moins sont ceux qui peuvent à la fois nourrir leur population et en exporter. Ainsi, le blé est un exemple des déséquilibres alimentaires mondiaux et devient, comme le pétrole, un enjeu géopolitique majeur.

Le commerce mondial du blé prend aujourd'hui encore plus d'importance. La logistique est essentielle pour rapprocher l'offre et la demande, et de nombreux acteurs publics ou privés sont impliqués dans la sécurité alimentaire mondiale. Bien que le blé soit cultivé dans près de 100 pays, sa production reste concentrée dans très peu de nations. Cela implique des échanges commerciaux pour que de nombreux pays puissent couvrir leurs besoins en blé. La croissance urbaine a renforcé cette réalité, et l'approvisionnement des populations en blé dépend fortement des autoroutes transocéaniques et transcontinentales d'un commerce agricole mondialisé et très tendu. Environ 160 millions de tonnes de blé sont échangées actuellement sur les marchés internationaux. Cela représente un montant de 50 milliards de dollars, ce qui en fait le produit agricole et alimentaire le plus échangé dans le monde. Le nombre de personnes dépendant des marchés internationaux pour se nourrir pourrait passer de 1 à 6, soit actuellement à 50% au milieu du siècle. Cette situation pose un problème car les régions où les productions agricoles et céréalières sont fortes ne sont pas nécessairement celles où les besoins augmentent. Les données de la FAO montrent que le déficit en blé pour les pays en développement est passé de 30 à 70 millions de tonnes entre 1970 et 2010, et il pourrait atteindre plus de 110 millions de tonnes d'ici 2050. Les dix principaux pays acheteurs de blé dans le monde sont l'Algérie, le Brésil, la Chine, la Corée du Sud, L'Égypte, l'Indonésie, l'Iran, le Japon, le Mexique et le Nigeria, chacun ayant acheté au moins 4 millions de tonnes de blé sur les marchés au cours des dernières années.

La Russie, qui a produit environ 86 millions de tonnes de blé en 2020, représente le premier fournisseur mondial du blé. En revanche, la production céréalière des deux géants asiatiques que sont la Chine et l'Inde est majoritairement destinée à couvrir leurs besoins.

Par rapport à la situation d'il y a 20 ans, une quantité supplémentaire de 60 millions de tonnes est mise sur le marché chaque année, dont 35 millions de tonnes de cette quantité proviennent de l'activité agricole de la Russie, l'Ukraine et le Kazakhstan. Les pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient polarisent le tiers des achats mondiaux de blé. Ces régions continueront d'importer le blé à l'avenir étant donné la vulnérabilité et la dépendance de l'extérieur pour nourrir sa population. L'Égypte par exemple, dont la population pourrait dépasser 100 millions d'habitant d'ici 2030, est déjà le plus grand importateur de blé dans le monde avec plus de 10 millions de tonnes importées par campagne. L'Algérie, le Maroc et la Tunisie suivent de près dans ce classement. La Russie et l'Ukraine représentent ensemble 28,47% des imports mondiales de blé. Du fait des conflits actuels entre ces deux pays, l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient qui importent chaque année la moitié de leurs besoins en blé sont actuellement les régions les plus menacées. L'Égypte, 1<sup>er</sup> pays importateur de blé dans le monde et principal client de ces deux géants mondiaux, est la plus impactée.

### **I.5.2. Situation en Tunisie**

Historiquement, la Tunisie fut longtemps considérée comme le grenier et le panier à pain de l'Empire romain, notamment grâce à sa capacité à produire une grande quantité de nourriture pour la population romaine, dont le blé et l'orge. Les terres agricoles de la Tunisie étaient particulièrement productives. En effet, la Tunisie présentait un sol relativement riche en nutriment et un climat doux et humide, et était rapidement dynamisée et bénéficiée de la mise en place d'un système agricole efficace qui comprenait l'utilisation de technique d'irrigation performante. Les Romains avaient réussi ainsi à maximiser la production céréalière.

Actuellement, la production de blé en Tunisie joue un rôle crucial dans la sécurité alimentaire du pays en raison de son importance dans les plats traditionnels tunisiens (couscous, etc.).

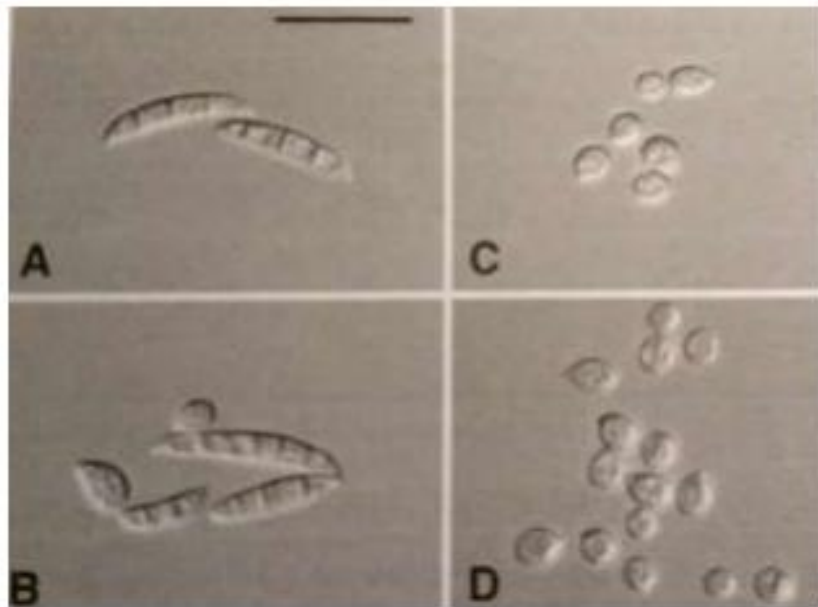
Cette culture présente néanmoins un rendement en grain très fluctuant car elle est essentiellement pluviale (environ 94%) et est donc largement impactée par la variabilité spatio-temporelle de la pluviométrie. Les surfaces irriguées sont très faibles avec à peine 80 000 ha. La Tunisie est un pays producteur de blé dur, recouvrant environ 65% de la production céréalière. Le blé tendre, initialement introduit par les colons, ne représente que 7,3% de la production totale selon le ministère de l'Agriculture pour la campagne 2020-2021.

La tradition récente de consommation du pain de farine blanche, des gâteaux et des biscuits a engendré une baisse dans la consommation individuelle du blé dur aux dépens du blé tendre. A cet égard, la production en blé tendre ne représente que 20% du besoin national, ce qui fait que la Tunisie importe chaque année 80% de ses besoins en blé tendre (environ 11 millions de quintaux).

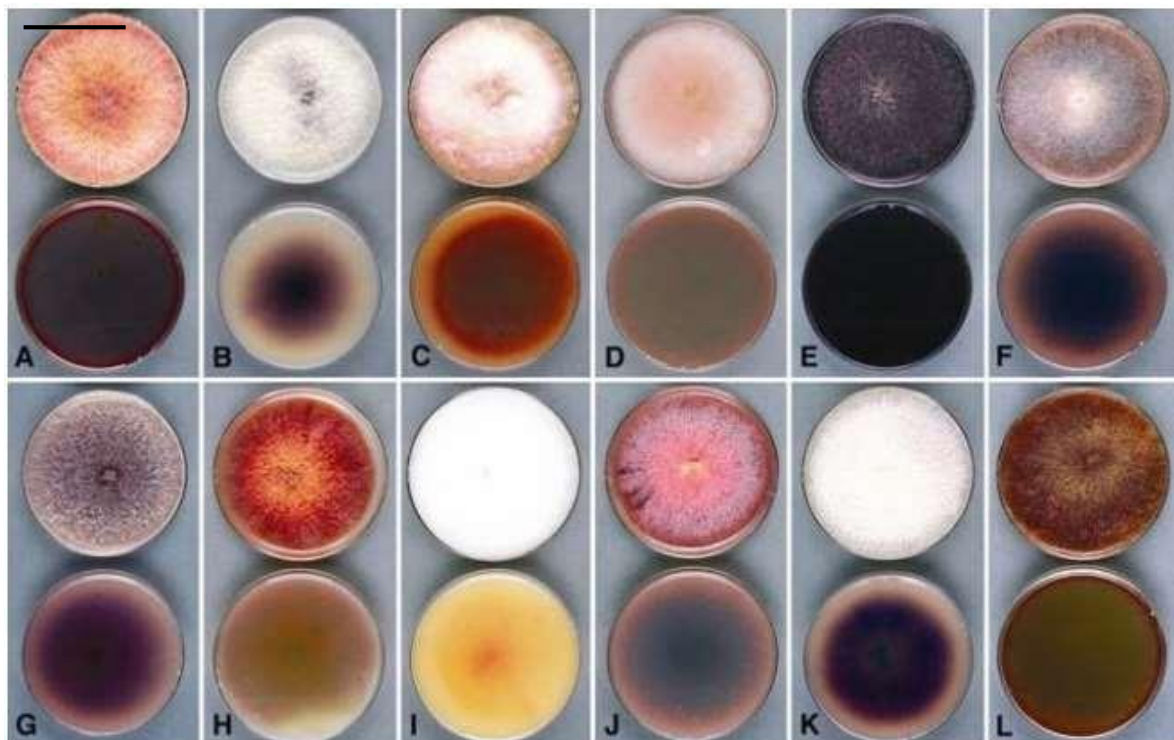
Avec près de la moitié de l'importation de blé tendre qui provient d'Ukraine, et un coefficient de dépendance étrangère pour les céréales de 61,3% en 2021 contre 29% en 2009, des agriculteurs appellent à favoriser les productions locales.

Pour atteindre l'autosuffisance en blé dur, la Tunisie a choisi d'augmenter les superficies en blé dur d'à peu près 30% avec un programme qui vise à accroître les capacités de stockage et à renforcer la chaîne logistique de collecte et de transport.

La standardisation variétale *via* la recherche a conduit à un appauvrissement de la biodiversité après les années 50. La valorisation des variétés locales de blé non compatibles avec les techniques de cultures modernes semble pourtant être une solution. Ces variétés autochtones semblent avoir des qualités très intéressantes comme la tolérance à de nombreuses conséquences du changement climatique (*eg* sécheresse, chaleur) et aux maladies fongiques, une bonne qualité nutritive et des exigences en eau deux fois moindre que les variétés modernes.



**Figure 6. Morphologie des spores chez *Fusarium* spp.** (Leslie et Summerell, 2006). **A** et **B** macroconidies ; **C** et **D** microconidies de *Fusarium poae*. Barre d'échelle = 25  $\mu$ m.



**Figure 7. Aspect macroscopique d'espèces de *Fusarium* sur milieu PDA** (Summerell et al., 2003). Les boîtes du haut de chaque paire correspondent au mycélium aérien, celles du bas à la vue de dessous des cultures. **A**, *F. poae*. **B**, *F. oxysporum*. **C**, *F. acuminatum*. **D**, *F. nelsonii*. **E**, *F. subglutinans*. **F**, *F. nygamai*. **G**, *F. pseudonygamai*. **H**, *F. lateritium*. **I**, *F. thapsinum*. **J**, *F. decemcellulare*. **K**, *F. verticillioides* et **L**, *F. culmorum*. Barre d'échelle = 5 cm.

## II. Les maladies fongiques du blé

Il existe plusieurs types de maladies fongiques ou cryptogamiques qui peuvent attaquer le blé à différents stades de croissance, réduisant ainsi la production en quantité et qualité. Ces maladies touchent les semences, les feuilles, l'épi, le collet et les racines, provoquant des symptômes qui leur sont spécifiques.

### II.1. Les maladies causées par *Fusarium culmorum*

Nous ne détaillerons ici que les maladies causées par *Fusarium culmorum*.

#### II.1.1. Le genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* a été décrit pour la première fois en 1809 sous le nom de *Fusisporium* par Link, directeur du jardin botanique de Berlin. Il tient son nom du latin *Fusus*, en raison de ses spores fusiformes. L'espèce type du genre *Fusarium* est *Fusarium roseum*.

Les champignons de ce genre sont répandus sur presque l'ensemble de la surface du globe. Ils sont présents dans les sols, les insectes, les eaux (réseaux urbains d'adduction), les racines et les graines de plusieurs plantes ligneuses et herbacées sauvages ou cultivées. Leur répartition s'étend des climats tempérés aux climats subtropicaux (Smith et Moss, 1985).

La présence et la prédominance d'une espèce de *Fusarium* ne sont pas limitées à une région ou un type de culture, mais elles sont déterminées par la plante hôte et les conditions climatiques.

Les champignons de ce genre sont classés de deux façons : anamorphe quand la forme asexuée est connue (forme imparfaite) et est appelée *Fusarium*, ou téléomorphe quand la forme sexuée est connue (forme parfaite) et est appelée *Gibberella* ou *Nectria*. La forme sexuée n'est pas observée chez toutes les espèces.

La reproduction asexuée est assurée par des spores ou conidies, dont la forme et la taille ont servi pour décrire et organiser la classification du genre *Fusarium*. Trois types de conidies peuvent être distingués (**Figure 6**) :

- *Les macroconidies*, sont fusiformes et cloisonnées. Elles permettent de différencier des espèces proches en se basant sur leurs formes, tailles et extrémités apicales et basales
- *Les microconidies* ne sont pas produites par toutes les espèces de *Fusarium*. Elles sont petites, septées ou non, avec des formes diverses (fusiformes, ovoïdes, en forme de rein ou de poire)
- *Les chlamydospores* sont des spores mycéliennes à paroi épaisse assurant la survie et la conservation de l'espèce. Elles ne sont pas présentes chez toutes les espèces et on les retrouve seules, en chaîne ou en bouquet

D'autres caractères secondaires ont été utilisés pour discriminer les *Fusarium* spp., comme la pigmentation qui diffère d'une espèce à une autre (**Figure 7**) liée à la production de métabolites secondaires particuliers, ou la vitesse de croissance.

Aujourd'hui, le genre *Fusarium* cible de nombreuses plantes ayant une importance économique majeure. Les espèces *F. graminearum* et *F. oxysporum* figurent parmi les cinq champignons les plus phytopathogènes à cause de leur prédominance et leur pouvoir myco-toxinogène puissant (Dean et al., 2012).

Le terme générique « fusarioses » est employé pour désigner les infections à *Fusarium*. Cette maladie, qui touche les céréales partout dans le monde, engendre des pertes économiques très importantes. Le pouvoir pathogène des *Fusarium* se manifeste de deux façons : soit par la dégradation de la tige, bloquant le passage de l'eau et des nutriments, ou alors par un affaiblissement généralisé des tissus infestés de la plante.

### **II.1.2. *Fusarium culmorum***

*Fusarium culmorum* (*F. culmorum*) est une espèce de champignons ascomycètes de la famille des *Nectriaceae* (**Tableau 3**). Sur milieu PDA, *F. culmorum* se développe rapidement et forme un mycélium aérien floconneux d'abord blanc qui devient ocre à rouge brunâtre. Au niveau des parties *verso* des boîtes de culture, le développement mycélien présente des teintes rouges à pourpre ou brun prononcées (**Figure 8**).

Chez *F. culmorum*, la forme sexuée n'est pas connue. De même, il ne produirait pas de microconidies. Les macroconidies sont abondantes, épaisses et pointues à leur sommet avec une face dorsale peu incurvée par rapport à la face ventrale qui est presque droite. Cette espèce est apte à engendrer des chlamydospores assez rapidement, c'est-à-dire après 3 à 5 semaines de pousse sur milieu gélosé. Ces structures trouvées en chaînes, en touffes ou seules, présentent des parois épaisses ayant une forme globulaire. Les chlamydospores sont associées aux macroconidies, et seraient plus persistantes que celles qui sont associées aux hyphes (**Figure 9**).

## **II.2. Les fusarioses causées par *Fusarium culmorum***

### **II.2.1. Mode de contamination**

Deux types de contamination des plantes par *Fusarium* existent : i) les contaminations endogènes si la semence est infectée avant plantation, et ii) les contaminations exogènes qui résultent d'infections provoquées par un sol contaminé ou par l'intermédiaire de vecteurs transportant des spores. Ces vecteurs peuvent être d'origine biotique comme les oiseaux ou les insectes, ou non biotique comme les résidus de culture, la pluie, le vent ou les mauvaises pratiques agricoles. Les vecteurs biotiques peuvent être attirés par des composés volatils produits par *Fusarium*, ce qui facilite la dissémination des spores et la contagion sur des plantes saines (Heit, 2018).

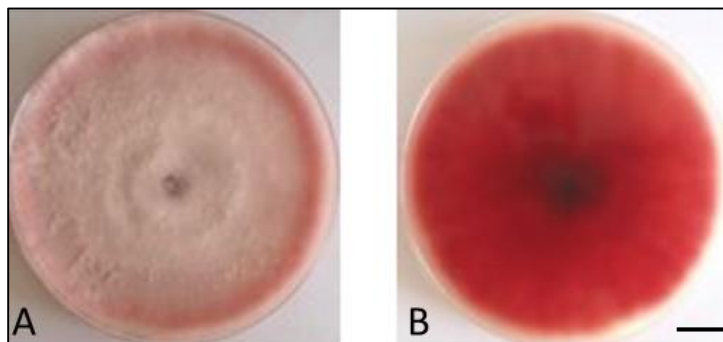
### **II.2.2. Plantes hôtes**

*F. culmorum* présente un large spectre de plantes hôtes, recouvrant principalement des céréales comme le blé, le maïs, le seigle, l'orge, l'avoine et le sorgho, ainsi que d'autres Poacées. Ce mycète a été isolé à partir de plusieurs plantes comme les pommes de terre, le haricot, la betterave à sucre, les fraises, le pois et le poireau. Il a été également isolé en tant que symbiote capable de conférer une double tolérance au sel et à la sécheresse chez *Leymus mollis* (Poacée américaine évoluant sur des dunes). A ce titre et de manière inattendue, il a été proposé comme agent de lutte biologique contre une mauvaise herbe aquatique, *Hydrilla verticillata* (Scherm et al., 2013).



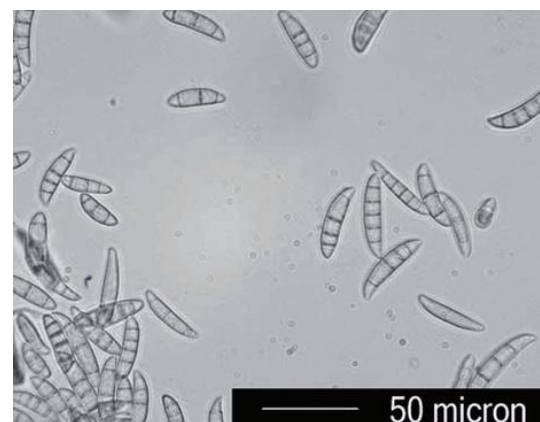
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous-classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Nectriaceae</i>
Genre	<i>Fusarium</i>
Espèce	<i>F. culmorum</i>

**Tableau 3. Classification hiérarchique de *Fusarium culmorum***  
 ((Wm.G.Sm.) Sacc, 1892).



**Figure 8. Aspect de *Fusarium culmorum* sur milieu PDA après 7 jours à 28°C** (source personnelle). (A) Face supérieure et (B) verso de la boîte de Pétri. Barre d'échelle = 1 cm.

**Figure 9. Macroconidies de *Fusarium culmorum*** (Pancaldi et al., 2010).





**Figure 10. Manque à la levée due à la fusariose des semences** (ARVALIS - Institut du végétal, 2020). Les couvertures végétales clairsemées correspondent à la mort des semis par infestations de *F. culmorum*.



**Figure 11. Brûle des semis de blé dur provoquée par *F. culmorum*** (source personnelle). (A) Coloration brune des racines et des coléoptiles des plantules infectées et (B) pourriture et mort des semis quelques jours après la germination. Barre d'échelle = 5 cm

### II.2.3. Pouvoir pathogène

*F. culmorum* est un saprophyte (capable de se nourrir de cellules hôtes mortes) développant une aptitude hautement compétitive. En tant que parasite facultatif des céréales, il forme un complexe de maladies sur les graines, les semis et les plantes adultes. Il est l'agent causal de trois types de fusariose : i) la fusariose des semences, ii) la fusariose des racines et du collet, et iii) la fusariose de l'épi (Heit, 2018).

### II.2.4. Epidémiologie

*F. culmorum* a été traditionnellement signalé comme l'agent responsable de la fusariose de l'épi en Europe du Nord, centrale et occidentale. De nos jours, les infections par *F. culmorum* sont rarement signalées, étant supplantées par celles occasionnées par *Fusarium graminearum*. Ce remplacement serait expliqué par l'utilisation du maïs fourrager comme culture de rotation avec le blé, favorisant l'accumulation de *F. graminearum* dans le sol. De plus, *F. culmorum* présenterait une tolérance moindre à l'évolution des conditions environnementales en cours, notamment liées aux changements climatiques.

Cependant, depuis quelques années, *F. culmorum* est désigné comme le principal agent de la fusariose de l'épi au niveau du pourtour Méditerranéen. Cette émergence serait due aux conditions humides qui surviennent durant les phases phénologiques de la floraison et du remplissage des grains. De même, les plus fortes incidences de fusariose de l'épi causée par *F. culmorum* dans ces régions sont également corrélées avec l'explosion de sa présence et la recrudescence des pourritures des racines et du collet dont il est également l'agent pathogène responsable.

D'un point de vue épidémiologique, les ascospores produites par le genre *Fusarium* et transportées par le vent sont primordiales pour la propagation de la fusariose de l'épi. Cependant, le fait que *F. culmorum* n'en produise pas rend sa propagation moins efficace par rapport à d'autres espèces de *Fusarium* qui les produisent (Scherm et al., 2013). Néanmoins, *F. culmorum* reste un cryptogame très préoccupant dans ces régions méditerranéennes, responsable de pertes substantielles du rendement du blé.

## II.3. La fusariose des semences

### II.3.1. Incidence

La fusariose des semences provoque un manque à la levée, une levée inégale et un retard de croissance des plants infestés. Cela se traduit par des zones de culture dépourvues de plants, à cause de graines qui n'arrivent pas à germer, ou de plantules qui ne peuvent pas émerger (**Figure 10**). Dans l'éventualité où elles émergent du sol, leur croissance s'accompagne par un développement d'une pourriture au niveau du sol qui entraîne leur affaissement et leur mort. Ce phénomène brutal se nomme la « fonte des semis » (Khan et al., 2006).

### II.3.2. Symptomatologie

L'infection des plants par *F. culmorum* se traduit par un développement mycélien épais autour des grains qui changent alors de couleur, virant vers une coloration plutôt rose blanchâtre. Ces graines deviennent brunes et molles, et pourrissent avant de germer. Sur des semis qui auraient germés, sont très rapidement observées une décoloration foncée du coléoptile et de la base de la tige, la nécrose des racines en formation, et l'apparition de lésions brunes à rougeâtres sur l'hypocotyle qui meurent avant ou juste après leur émergence à la surface du sol (**Figure 11**).

Les semis survivants mais infestés développeront généralement des lésions brunâtres (symptômes de pourriture) qui s'étalent au niveau des racines et du collet. Cependant, des infections asymptomatiques peuvent également survenir (Antalova et al., 2020).

### II.3.3. Conditions favorables

Les conditions qui peuvent être favorables au développement de cette maladie sont :

- *L'humidité* : les conditions fraîches et humides ralentissent la germination et la levée des graines, ce qui augmente la fréquence de la brûlure des semis
- *La température* : les températures fraîches et modérées, situées entre 15°C et 25°C, sont optimales pour la croissance et la propagation de *F. culmorum*
- *Le pH* : les sols légèrement acides avec un pH compris entre 5,5 et 7 sont plus propices au développement des infections
- *Les sols lourds* avec une teneur en argile et une mauvaise aération favorisent le risque d'émergence de cette maladie
- *Les blessures des semences* : les semences endommagées sont plus vulnérables à l'infection par *F. culmorum*

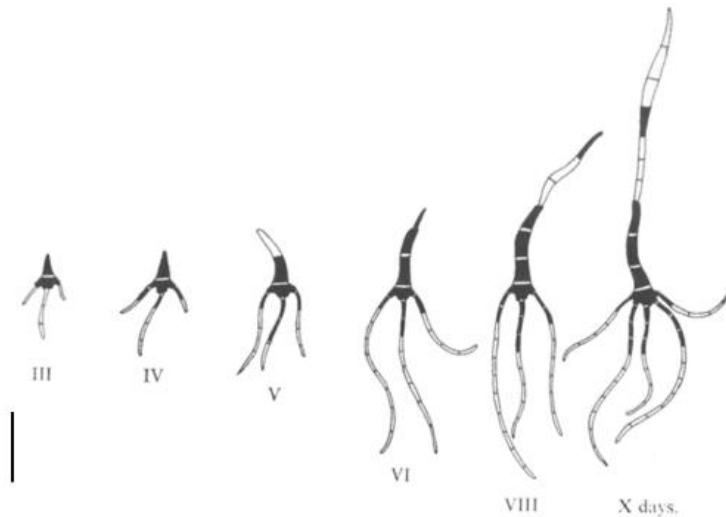
### II.3.4. Mécanisme d'infection

Lorsque les graines infestées par *F. culmorum* sont semées, les jeunes plants développent rapidement les symptômes décrits préalablement (cf section II.3.2.). La pénétration et l'invasion du champignon se produisent à travers l'hypocotyle et/ou le coléoptile (**Figure 12**). Le champignon progresse dans les premières et deuxièmes racines séminales primaires, mais il reste limité autour de l'hypocotyle à 1,5 cm environ. Des lésions brunes caractéristiques apparaissent alors dans les régions basales des racines. Quant à l'infection des feuilles, elle se réalise dès 6 jours après le semis. Elle résulterait probablement d'une infection secondaire liée à la propagation de spores. Dans le cas d'un sol infecté par *F. culmorum*, l'infection reste similaire mais elle peut toucher des régions de racines plus éloignées (**Figure 13**).

Des coupes au niveau des hypocotyles de semis âgés de 3 jours ont montré la présence d'hyphes de *F. culmorum* au niveau des espaces intercellulaires, ainsi qu'à l'intérieur des cellules.

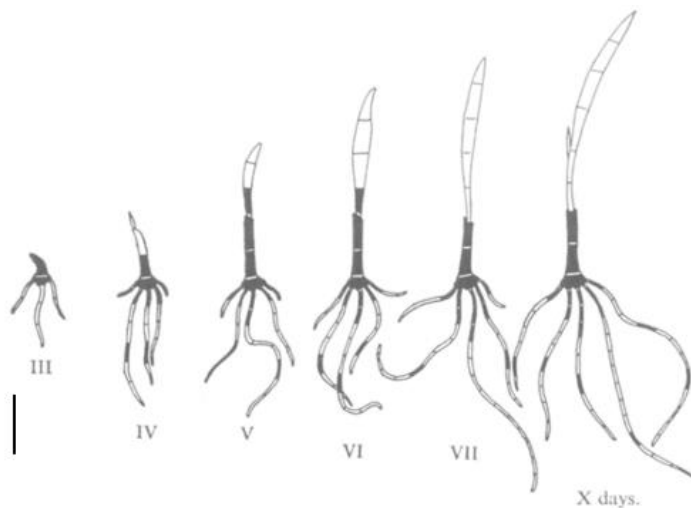
Ces hyphes pénétreraient le cortex primaire des racines, pour ensuite se développer dans les espaces intercellulaires des tissus de l'hypocotyle. Ils se propagent enfin vers le haut dans le coléoptile, ainsi que vers le bas dans les racines, avec une production de masses denses d'hyphes intracellulaires.

Dans le cas d'inoculation de coléoptiles de semis poussant en conditions de stérilité (milieu axénique), les spores de *F. culmorum* germent au bout de deux jours d'incubation. Après le 4<sup>ème</sup> jour, de nombreux hyphes se forment à la surface du coléoptile. La pénétration des hyphes surviendrait à travers les stomates (**Figure 14**) et/ou les cellules épidermiques du coléoptile. C'est alors qu'un tapis dense d'hyphes se forme à la base de la cavité sous-stomatique. A partir de ce tapis, des hyphes se développent rapidement et en direction parallèle le long des parois longitudinales des cellules hôtes. A ce moment, de petites lésions brunes apparaissent sous forme de taches longitudinales, et une désorganisation sévère des cellules du coléoptile survient accompagnée de la formation de cavités plus ou moins étendues et profondes (Malalasekera et al., 1973).



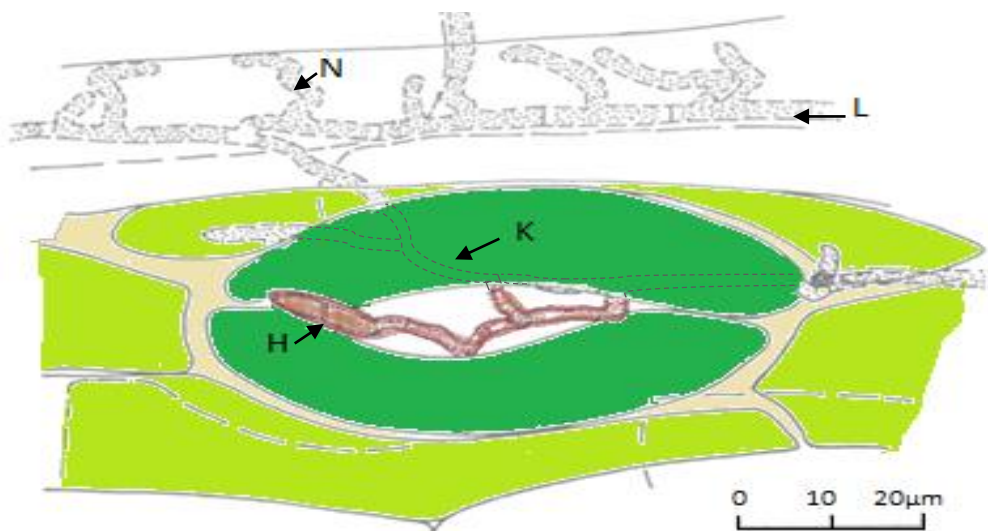
**Figure 12. Progression de l'infection des semis de blé issus de graines infectées par *F. culmorum* 10 jours après la germination**

(Malalasekera et al., 1973). Les portions noires sont des parties infectées de 5mm de longueur. Barre d'échelle = 1 cm



**Figure 13. Progression de l'infection des semis de blé issus de graines semées dans un sol contaminé par *F. culmorum* 10 jours après la germination**

(Malalasekera et al., 1973). Les portions grises sont des parties infectées de 5mm de longueur. Barre d'échelle = 1 cm

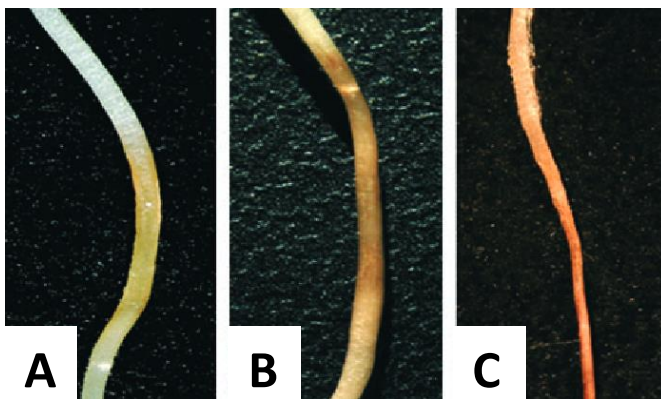


**Figure 14. Processus d'infection de *F. culmorum*** (Malalasekera et al., 1973). (H)

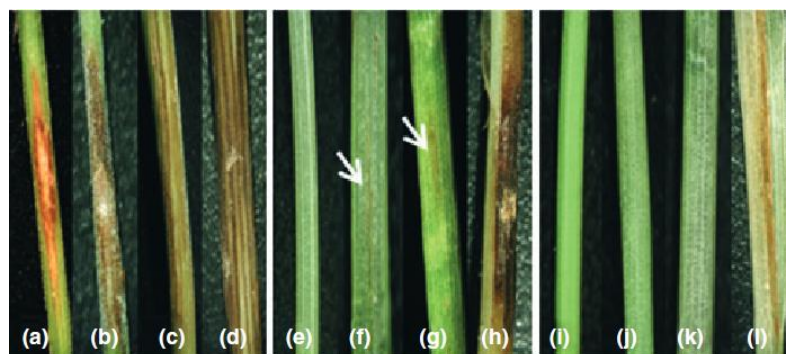
Pénétration d'un tube germinatif d'une conidie en germination à travers un stomate du coléoptile ; (K) Développement intercellulaire des hyphes traversant la cavité sous-stomatique ; (L) Croissance parallèle des hyphes dans l'axe des cellules de l'hôte et (N) Développement d'hyphes radiaux.



**Figure 15. Symptômes de la pourriture des pieds et des racines** (Scherin et al., 2013). (A) brunissement à la base de la tige et (B) décoloration rose-rougeâtre des nœuds du chaume.



**Figure 16. Evolution des symptômes visibles de *Fusarium culmorum* sur les racines primaires de blé 24h (A), 48h (B) et 96h (C) après l'inoculation** (Beccari et al., 2011). (A) Tissu légèrement nécrotique et translucide ; (B) Région nécrotique augmentée et symptômes plus étendu et (C) Nécrose généralisée et profonde des tissus, accompagnée de l'effondrement du tissu racinaire distal.



**Figure 17. Evolution des symptômes visibles de *F. culmorum* sur la base de la tige de blé des premières (a-d), deuxièmes (e-h) et troisièmes (i-l) gaines foliaires basales à 3, 7, 14 et 21 jours après l'inoculation** (Beccari et al., 2011). Les flèches blanches indiquent la présence de petites zones nécrotiques.

## II.4. La fusariose des racines et du collet

L'identification de cette maladie est précise à partir de la fin de l'extension de la tige. Les symptômes se traduisent par une coloration brune foncée des nœuds inférieurs, avec des stries sombres à la base de la tige. Sur les plantes les plus âgées, l'infection peut produire un véritable piétin où la base de la tige devient brune et pourrie. Cet événement entraîne la verse du plant (**Figure 15A**). En présence d'une forte humidité, une décoloration rose rougeâtre se forme sur les nœuds, notamment à cause du développement du mycélium sporulant du champignon (**Figure 15B**).

Au début de l'infection, les symptômes racinaires apparaissent sous forme de légères nécroses sur un tissu translucide. Le nombre de ces nécroses augmente rapidement, et les symptômes s'étendent au-delà du point d'infection pour atteindre la graine. Après quelques jours, les nécroses se généralisent, et le tissu radicaire distal s'effondre définitivement (**Figure 16**).

Au niveau de la tige, les symptômes commencent par des petites lésions nécrotiques sur la première gaine foliaire. Ces symptômes augmentent rapidement en direction verticale et s'étendent sur toute la gaine foliaire. Puis, le champignon pénètre pour attaquer la deuxième et la troisième gaine foliaire, finissant par infecter en tout ou partie le jeune plant (**Figure 17**) (Beccari et al., 2011).

### II.4.1. Mécanismes d'infection

Une analyse par microscopie confocale à balayage laser a montré qu'au cours du processus d'infection, les hyphes de *F. culmorum* commencent par coloniser la couche de cellules rhizodermiques et la première couche de cellules du cortex par voie apoplasmique (**Figure 18A et B**). La colonisation du cortex continue par l'invasion symplasmique massive d'un mycélium dense à l'intérieur de la lumière des cellules corticales (**Figure 18C**). Cependant, le champignon ne pénètre pas dans l'endoderme, ni dans la dernière couche de cellules corticales. De même, il semble être absent des vaisseaux du protoxylème et du métaxylème dans la stèle. Les hyphes sur la surface externe rhizodermique produisent des conidiophores et des conidies 120 heures après l'inoculation (Beccari et al., 2011).

Au niveau de la base de la tige, les hyphes de *F. culmorum* se développent sur la surface épidermique de la gaine foliaire. Après pénétration des hyphes *via* les stomates, leur progression à l'intérieur est horizontale (**Figure 19**). La colonisation s'étend à la couche cellulaire du mésophile où la croissance serait alors intercellulaire (Beccari et al., 2011).

### II.4.2. Fusariose de l'épi

La propagation de cette maladie est assurée par le vent ou les pluies au moment de la floraison. Les gouttes d'eau chargées de spores rebondissent d'étage foliaire en étage foliaire, pour atteindre l'épi. Une brûlure partielle de la tête avec un ou plusieurs épillets blanchis prématurément, ou la brûlure de la totalité de l'épi, sont les symptômes de la fusariose de l'épi (**Figure 20A et B**). Après l'infection des épillets, des taches brunes à claires gorgées d'eau se développent sur les glumes qui deviennent alors bruns foncés. Ces épillets restent vides ou contiennent des grains gris bruns très peu développés. Dans des conditions favorables, une coloration brune violacée peut être observée au niveau de la tige sous l'épi. De même, dans des conditions d'humidité élevées, des sporodochies de couleur rose à orange se développent à la base des épillets ou entre les glumes et lemmes (**Figure 20C et D**) (Scherm et al., 2013).

La fusariose de l'épi provoque une malformation, un dessèchement et un mauvais remplissage des grains. Il apparaît que plus la fusariose frappe tôt, plus les dégâts sont considérables.

#### **II.4.3. Mécanisme d'infection**

Les conidies infectent les épis de blé pendant la floraison. Cette infection dépend de plusieurs facteurs comme la température, l'humidité et le niveau de résistance des cultivars. Les conidies germent sur les surfaces internes de la glumelle supérieure (paléa) et inférieure (lemma), ainsi que sur l'ovaire dans les 12 à 14h après l'infection. La colonisation mycélienne se poursuit ensuite de façon intra- et extracellulaire, formant un mycélium dense qui atteint l'endosperme au bout de 12 à 24h.

Au début de l'infection, *F. culmorum* peut avoir une courte phase biotrophique dans les tissus (se développer sur des cellules vivantes sans les détruire), et ce au début de l'infection. Mais ce champignon devient rapidement nécrotrophe, tuant les cellules de son hôte puis colonise les tissus morts. Cette aptitude serait liée à la production de mycotoxines et d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires (Scherm et al., 2013).

L'étude de Jackowiak et al. (2005) par microscopie à balayage a confirmé la localisation d'hyphes de *F. culmorum* à la surface et à l'intérieur du tissu de la graine de blé, ainsi que la présence d'hyphes dans l'endosperme (**Figure 21**).

#### **II.5. Cycle de vie de *Fusarium Culmorum***

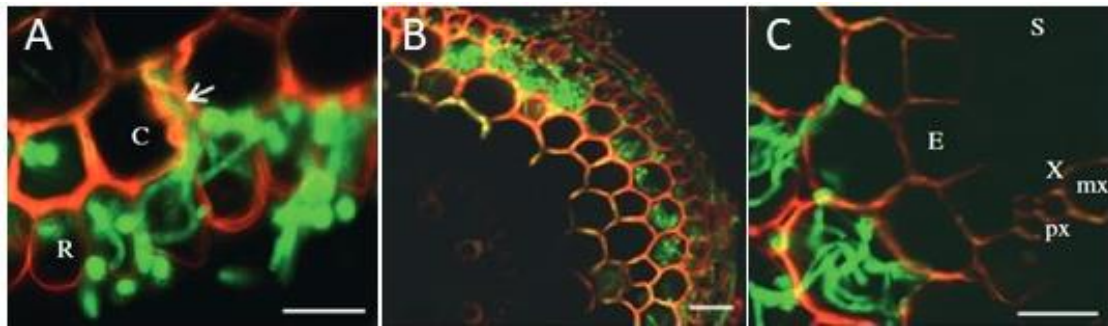
L'origine des infections primaires par *F. culmorum* serait due à des semences infectées. Elle survient à partir de débris de culture et de sol initialement contaminés. *Fusarium* peut être présent à la surface de la graine sous deux formes : des spores libres ou du mycélium. Les plantules détruites par le parasite en pré- ou post-émergence représentent le premier foyer infectieux, devenant ainsi une source sérieuse de contamination pour le sol et les plantes voisines. Les spores provenant de la brûlure des semis ou de la pourriture du pied qui passent d'un étage foliaire à un autre par éclaboussures des conidies correspondent au deuxième foyer d'infection ; elles seraient la principale source pour la brûlure de l'épi (Scherm et al., 2013). La maladie se perpétue d'année en année par les semences infectées, l'émission de spores formées sur une plante infectée, et un sol contaminé (**Figure 22**).

#### **II.6. Biosynthèse des mycotoxines chez *F. culmorum***

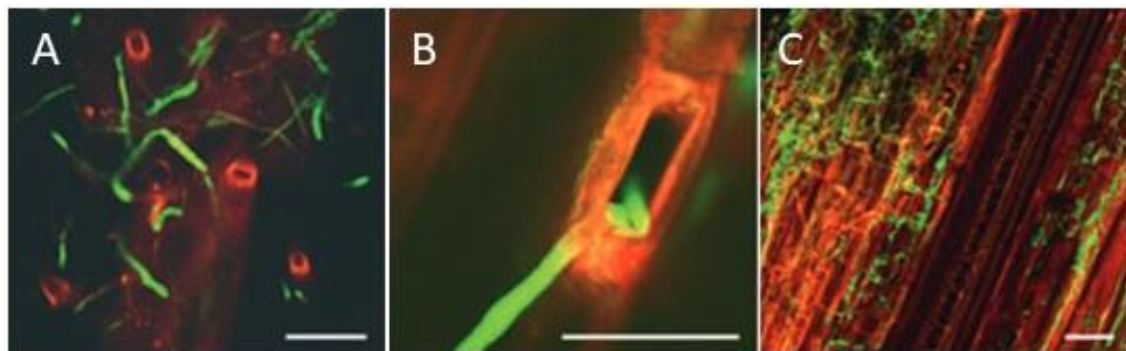
Les mycotoxines sont des substances chimiques toxiques. Elles sont issues du métabolisme secondaire des champignons qui les synthétisent aussi bien sur la plante en champs que lors du stockage des grains (Heit, 2018).

Les principales mycotoxines produites par *F. culmorum* sont les trichothécènes (Déoxynivalénol (DON), Nivalénol (NIV) ; 3-acétyldéoxynivalénol, 3-DON ; et Acétyl-T2 toxine), la zéaralénone (ZON) et les Fusarines. La biosynthèse de ces mycotoxines est influencée par plusieurs facteurs comme la température, l'humidité et les nutriments présents. Ainsi, des conditions chaudes et humides favorisent la production de trichothécènes. Ces trichothécènes, qui constituent le plus grand groupe de mycotoxines, jouent un rôle dans la pathogenèse et l'agressivité de *F. culmorum*. Par conséquent, l'aptitude de *F. culmorum* à infecter le blé est liée à sa capacité à produire une grande quantité de DON dans les tissus infectés. Quant à leur mode d'action, les DON seraient des inhibiteurs puissants de la synthèse des protéines ; ces mycotoxines limitent ainsi l'activation des gènes de défenses et la production de certaines défenses végétales, et seraient capables d'induire une perte quasi-complète des pigments chloroplastiques, et ce à des concentrations sublétales (Wagacha et al., 2007 ; Scherm et al., 2013).





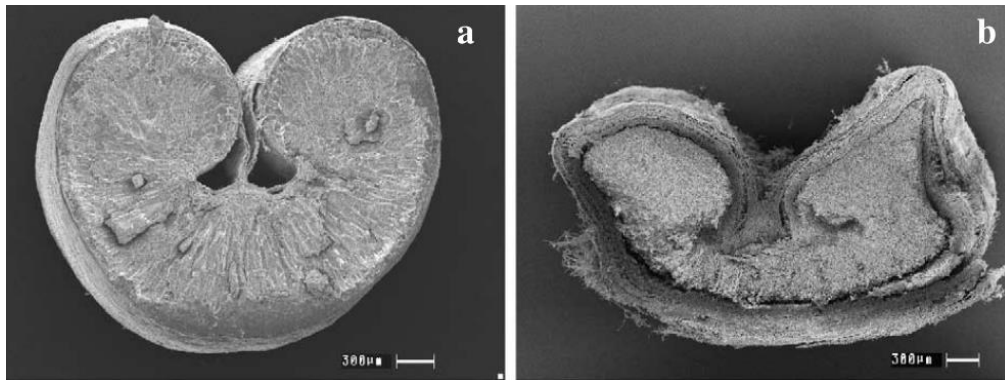
**Figure 18. Développement de *F. culmorum* sur les racines primaires des semis de blé.** Images réalisées à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser (Beccari et al., 2011). (A) Invasion rhizodermique des hyphes (flèche en blanc) dans l'espace extracellulaire ; (B) Colonisation du cortex dans les espaces intracellulaires à 24h après l'inoculation et (C) Avancement de la colonisation du cortex à 48h après l'inoculation par voie apoplasmique et par invasion symplasmique de la lumière des cellules colonisées. R, rhizoderme ; C, cellules du cortex ; E, endoderme ; S, stèle ; X, vaisseaux du xylème ; mx, vaisseaux de métaxylème ; px, vaisseaux de protoxylèmes. Barres d'échelle, 25 µm.



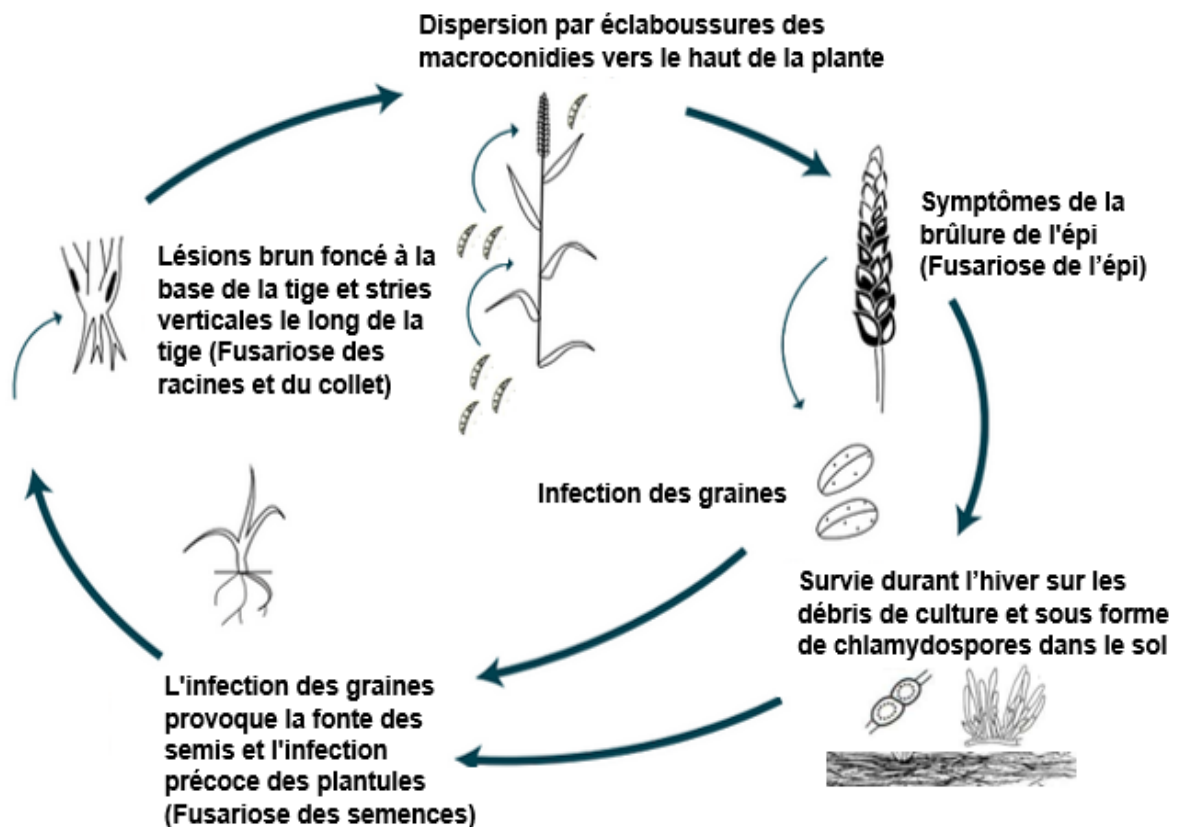
**Figure 19. Colonisation de *Fusarium culmorum* des premières gaines foliaires basales de blé 3 jours après l'inoculation.** Images obtenues par microscopie confocale à balayage laser (Beccari et al., 2011). (A) Conidies en germination sur la surface foliaire ; (B) Pénétration de *F. culmorum* à travers les stomates et (C) Réseaux d'hyphes de *F. culmorum* sur les cellules épidermiques du tissu inoculé. Barres d'échelle, 50 µm.



**Figure 20. Symptômes de la fusariose de l'épi causée par *Fusarium*** (Scherm et al., 2013). (A) brûlure partielle et (B) brûlure totale de l'épi ; (C) décoloration brune/violacée de la base de l'épi et (D) sporodochies orange sur les épillets.



**Figure 21. Coupes transversales de grains sains et infectés par *F. culmorum* de blé de printemps** (Jackowiak et al., 2005). (a) Coupe transversale réalisée au niveau du centre d'un grain sain. (b) Coupe transversale au centre d'un grain infecté. Ici, le grain est déformé et renferme des hyphes abondants à la surface et à l'intérieur des endodermes. Barres d'échelle, 300 µm.



**Figure 22. Cycle de vie de *Fusarium culmorum*** (source personnelle). Ce cycle commence par des semences infectées ou un sol contaminé par des spores libres. Le développement mycélien provoque une brûlure des semis ou une pourriture du pied (premier foyer infectieux). L'infection se propage alors grâce à des conidies d'un étage foliaire à un autre par éclaboussures (deuxième foyer infectieux). Apparaît alors la brûlure de l'épi, et la maladie se perpétue d'année en année.

### III. Interaction plante micro-organismes

#### III.1. Généralités

Une large gamme de métabolites émise par la plante est impliquée dans l'interaction hôte-pathogène durant l'infection, et la production de mycotoxines. Lors d'une infection aboutissant à une relation incompatible, les cellules végétales réagissent par une réaction d'hypersensibilité en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Les propriétés oxydatives de ces ROS (en particulier  $H_2O_2$ ) modulent la biosynthèse des trichothécènes, notamment en induisant l'activation de l'expression des gènes *TRI* (Trichothecene biosynthetic genes). Une croissance typique de *F. culmorum* s'accompagne d'une augmentation de pH au cours de l'infection suivie d'une augmentation de l'expression d'activité des enzymes extracellulaires et de la production de DON. Le rôle des *Cell wall-degrading enzymes* (CWDE) est très important dans la virulence de *F. culmorum* car ces enzymes lytiques sont capables d'hydrolyser la cellulose, le xylane et la pectine de la paroi cellulaire des plantes (PCW : *plant cell wall*). Ces activités hydrolytiques assurent ainsi l'envahissement des hyphes au sein des tissus de l'hôte, et ce en 3-4 jours. De manière remarquable, ces activités hydrolytiques peuvent se dérouler avant même toute présence d'hyphes fongiques, ce qui suggère l'existence de flux apoplasmique de ces enzymes. Lors d'une infection par *F. culmorum*, les graines et les jeunes plants de blé synthétisent plusieurs protéines liées à la pathogénèse (ou PR-protéines pour *Pathogenesis-Related proteins*), comme des glucanases (PR1, PR2), chitinases (PR3), peroxydases (POX, PR9) et la protéine PR Wheatwin1-2 (PR4). Dans le cas de racines de blé infectées par *F. culmorum*, l'expression des gènes associés à la défense au niveau des gaines foliaires augmente même si ces tissus n'avaient pas encore été en contact avec le champignon. Ces expressions indiquent l'existence d'une réponse systémique. Certains métabolites végétaux secondaires, présents en plus grande quantité chez les variétés résistantes à la fusariose de l'épi, ont montré un effet inhibiteur sur la croissance fongique et/ou la production de mycotoxines par les espèces de *Fusarium*. Il s'agit de composés phénoliques et polyphénoliques incluant des acides benzoïques et cinnamiques, des furanocoumarines, des phénylpropanoïdes, des chromènes et flavones ; la plupart peuvent s'accumuler dans les parois cellulaires. En réponse à l'infection, les cellules végétales sécrètent des phénols au niveau de la paroi cellulaire, ce qui permet de limiter significativement la propagation du pathogène en renforçant les composants structurels de la plante. Ces phénols présentent en plus des propriétés antioxydantes (*ie* capture de ROS) (Scherm et al., 2013). Les défenses végétales sont remarquablement riches en composés. Puisqu'elles jouent un rôle essentiel dans les activités de protection des agents de biocontrôle, ces défenses seront spécifiquement détaillées dans la section IV.

#### III.2. Moyen de lutte contre *F. culmorum*

*Fusarium culmorum* est un pathogène difficile à gérer. Il peut survivre au niveau du sol sous forme d'hyphes dans les résidus de chaume de céréales et d'autres graminées. De même, il a la capacité de persister sous forme de chlamydospores dans le sol. La présence de *F. culmorum* sur ou à l'intérieur de semences infectées est non seulement responsable de la mort des plantules en pré- ou post-levée, mais elle contribue également à l'augmentation de la charge fongique dans le sol. La capacité de *F. culmorum* à produire des mycotoxines rend encore plus compliquée la conception d'une stratégie efficace pour lutter contre ce pathogène.

Une approche de lutte intégrée est nécessaire combinant des mesures de lutte génétique, agronomique, chimique et biologique. L'adoption de cultivars de blé résistants à l'infection n'est pas possible car les variétés complètement résistantes n'existent pas. Une solution efficace consiste à mettre en œuvre des rotations de culture avec des hôtes intermédiaires non céréalières, comme les légumineuses, la luzerne et les *Brassicaceae*. Cette pratique culturale peut réduire l'incidence de la maladie, cependant le rythme de ces rotations est de plus en plus court depuis quelques années car le blé est la culture dominante en Tunisie avec environ 60% de la superficie céréalière (Khemir et al., 2020). L'enrobage des semences saines avec des fongicides est un moyen plus efficace, mais son efficacité est limitée aux premiers stades de croissance. L'utilisation prolongée des fongicides induit une pression sélective sur les populations fongiques et augmente progressivement le niveau de résistance (Hellin et al., 2018). D'autres approches alternatives reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs naturels comme les huiles essentielles d'origine végétale, certains monoterpènes et composés phénoliques naturels. Ces molécules sont capables de contrecarrer les potentiels pathogène et myco-toxinogène des populations naturelles de *Fusarium*, et de stimuler la résistance naturelle de l'hôte qui agirait directement sur la physiologie générale des phases saprophytes du champignon (Scherm et al., 2013).

L'intégration de plusieurs approches de lutte biologique, comme le traitement des résidus de culture, des semences ou de la plante hôte par des antagonistes naturels, représente une solution efficace pour le contrôle de *F. culmorum*. Ces approches offrent également l'opportunité de limiter l'utilisation des fongicides chimiques qui sont le moyen de lutte le plus répandu dans le monde contre les épidémies de fusarioses des céréales (D'angelo et al., 2014).

### **III.3. Le Biocontrôle et la lutte biologique**

Le biocontrôle de maladie des plantes est l'utilisation d'organismes vivants, de produits naturels ou de mécanismes biologiques afin de limiter la population et/ou la nocivité des ennemis des cultures comme les rongeurs, insectes, nématodes, maladies des plantes et mauvaises herbes. La lutte biologique est une composante spécifique du biocontrôle qui se concentre sur l'utilisation d'organismes vivants. Cette approche alternative s'appuie sur des régulations préventive, curative et durable d'importants ravageurs par la valorisation de leurs ennemis naturels. Cette interaction implique trois éléments : i) le ravageur, ii) l'auxiliaire et iii) son habitat (Altieri et al., 2005 ; Boller et al., 2004). Les auxiliaires, appelés aussi antagonistes ou ennemis naturels, peuvent être tous les organismes vivants selon la façon avec laquelle on examine leur écologie.

Le biocontrôle peut être défini aujourd'hui comme « *l'utilisation d'organismes bénéfiques, de leurs gènes et/ou de produits, tels que des métabolites, pour réduire les effets négatifs des agents pathogènes des plantes et favoriser les réponses positives de la plante* » (Vinale et al., 2008 ; Tranier et al., 2014).

Dans notre étude on s'intéresse uniquement aux micro-organismes, bactéries et champignons, qui peuvent être qualifiés d'agents de biocontrôle (BCA, *Biocontrol agents*) et également de promoteur de croissance végétale (PGP, *Plant growth promoting*).

### **III.3.1. Les grands Types de lutte biologique**

#### **III.3.1.1. Lutte biologique par introduction ou acclimatation**

Dans ce type de lutte, un auxiliaire d'origine exotique ou locale est introduit dans un milieu colonisé par un ravageur ou un pathogène afin d'en contrôler les populations. Cette méthode ne nécessite pas ou peu d'intervention une fois l'introduction réalisée, et elle est utilisée avec succès en champs (Winkler, 2005).

#### **III.3.1.2. La lutte biologique augmentative**

Lorsque des ennemis naturels sont absents d'un environnement agricole (par exemple, des serres ou des cultures en rangées immédiatement après la plantation), ou que leur prédominance est trop faible pour en assurer le contrôle, les auxiliaires exotiques ou indigènes sont libérés soit en petite quantité (lutte biologique « inoculative ») et c'est leur descendance qui sera efficace, soit en grande quantité (lutte biologique « inondative ») quand la population du ravageur est très large. Cette méthode est employée dans des systèmes fermés comme les serres (Winkler, 2005).

#### **III.3.1.3. La lutte biologique par conservation**

Il s'agit d'un ensemble de mesures prises pour augmenter l'impact des auxiliaires déjà présents dans la culture et qui sont des ennemis naturels des ravageurs des cultures (Dib, 2010).

### **III.3.2. Mécanismes d'action des agents de lutte biologiques**

Pour améliorer les stratégies d'application des agents de lutte biologique, il est essentiel de comprendre les mécanismes avec lesquelles ces agents interagissent avec l'agent pathogène.

#### **III.3.2.1. Interactions trophiques**

Les interactions de type compétition pour l'espace et les nutriments entre l'agent de lutte (parasite ou parasitoïde) et le pathogène (son hôte) peuvent entraîner une diminution de la croissance et de l'activité du pathogène.

Le parasitisme où un parasite bénéficie de son hôte en lui faisant subir des dommages physiologiques et/ou physiques mesurables, et la prédation où un prédateur se nourrit de la biomasse de son hôte, sont des comportements trophiques stratégiques qu'il faut valoriser plus encore et qui répond parfaitement aux objectifs de luttés par biocontrôle. Les agents pathogènes se regroupent en trois modèles trophiques différents : biotrophie (se développer sur des cellules vivantes sans les détruire), nécrotrophie (tuer les cellules puis coloniser les tissus morts) et saprophytisme (se nourrir de cellules mortes). Ces modèles trophiques influencent et structurent les interactions entre les organismes vivants. De même, ces modèles définissent les mécanismes d'action à différents degrés et constituent la base du biocontrôle (Pellan, 2020).

Par conséquent, le succès de l'emploi à grande échelle d'un agent vivant en lutte biologique est le résultat souvent combiné de l'optimisation du mutualisme entre la plante et des agents bénéfiques, ou de l'antagonisme entre les pathogènes et les agents de lutte biologique (compétition, parasitisme, prédation).

### III.3.2.2. Mécanismes d'action des agents de lutte biologique

#### *Antibiose*

L'antibiose est une arme majeure des BCA. Ce mécanisme concerne les micro-organismes producteurs de composés antimicrobiens ayant une action directe sur la physiologie des pathogènes. Parmi ces composés, sont le plus généralement cités des enzymes lytiques, les antibiotiques et des composés antifongiques (Reino et al., 2008). Ces composés antimicrobiens, qui existent sous des formes soluble ou volatile, ciblent différentes structures ou voies métaboliques chez l'agent pathogène. Ils sont capables de freiner sa croissance, de réduire la production de facteurs de virulence, voire de le détruire et ce par action directe sur le pathogène ou à distance. Par exemple, les enzymes lytiques sont capables d'hydrolyser plusieurs composés polymères comme les protéines, la cellulose, la chitine et l'ADN des pathogènes (Pal et Gardener, 2006).

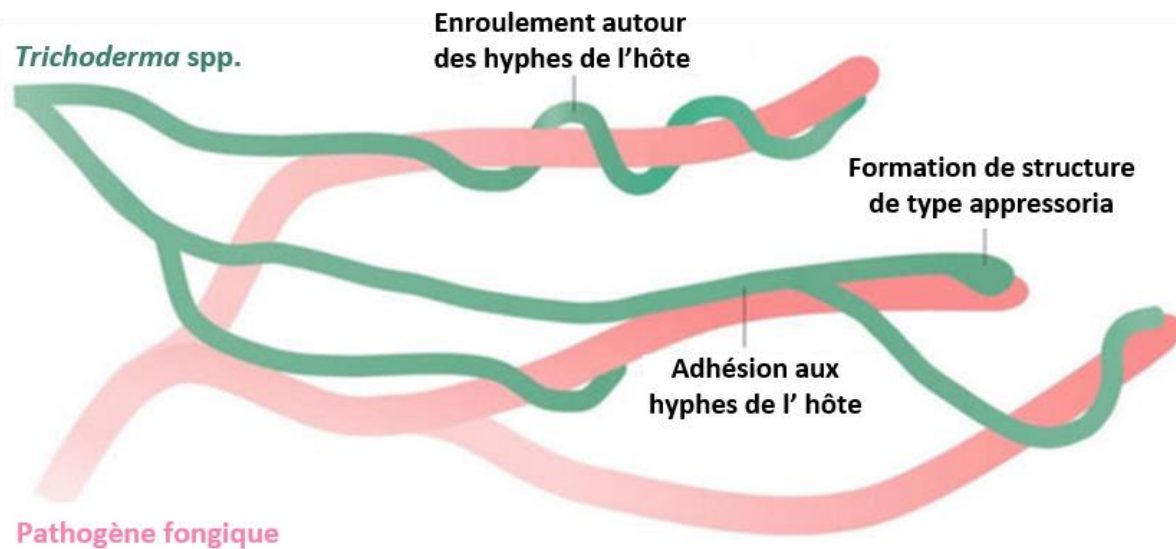
Plusieurs genres de BCA comme *Trichoderma* spp., *Streptomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. et *Kluyveromyces* spp. sont capables de produire des composés toxiques pour les champignons pathogènes. Ces composés incluent, notamment, les peptaïbols, la viridine, la gliovirine, la gliotoxine et les glisoprénines (Daguerre et al., 2014 ; Abdallah et al., 2018).

#### *Mycoparasitisme*

Le mycoparasitisme traduit l'aptitude parasitaire développée par un agent vivant sur un micro-organisme fongique, matérialisée par des actions d'attaque et de dégradation métabolique aboutissant à la mort de la proie (Kim et Vujanovic, 2016). Le mycoparasitisme se déroule en plusieurs étapes séquentielles. La présence de l'agent pathogène stimule le BCA par chimiotropisme. Le BCA dirige ses hyphes (si c'est un mycète) ou sa population bactérienne vers son hôte, et identifie sa surface cellulaire (phénomène de reconnaissance moléculaire). Cette première étape est suivie par une adhésion et un attachement du mycoparasite aux parois de son hôte. Dans le cas de *Trichoderma*, mycète qui est le myco-parasite le plus étudié, ses hyphes poussent parallèlement le long des hyphes du pathogène dans une interaction intime, voire peuvent s'enrouler autour de son hôte (**Figure 23**). Le contact direct est renforcé par l'émission d'organes particuliers tels que les appressoria, les haustoria et des tubes de pénétration, voire l'émission de structures en forme de crochet (Jefferies, 1995). Une pénétration peut se produire, conduisant à une perforation de la paroi cellulaire, et une reprogrammation des flux de matière chez l'hôte au profit du BCA qui induit alors une perte de turgescence de l'hôte, et finalement une lyse cellulaire. Il a été rapporté que le parasitisme implique la production d'enzymes lytiques qui dégradent la paroi cellulaire du pathogène. Cette action lytique faciliterait l'accès à la membrane cellulaire de l'hôte et ainsi l'assimilation de son contenu cytosolique (Daguerre et al., 2014).

#### *Bio-compétition*

Certains BCA peuvent entrer en compétition nutritionnelle et/ou spatiale avec d'autres organismes lorsqu'ils ont besoin du même nutriment essentiel et/ou quand ils partagent le même espace limité (de Boer et al., 2003). Dans des niches écologiques particulières, la bio-compétition entre un BCA et un agent pathogène ayant les mêmes exigences physiologiques peut se produire. Le BCA peut alors modifier certains facteurs abiotiques comme le pH, ou la disponibilité en O<sub>2</sub>, en nutriments et en eau, conduisant ainsi à l'inhibition du développement de l'agent pathogène (Samsudin et al., 2016a ; Gardiner et al., 2009 ; Picot et al., 2010).



**Figure 23. Schéma de l'interaction mycoparasitaire des hyphes de *Trichoderma* avec les hyphes d'un pathogène fongique** (Tyśkiewicz et al., 2022). L'effet mycoparasitaire de *Trichoderma* sur un pathogène fongique (qui lui est hôte) comprend la détection des proies et la chimiotaxie, l'adhésion à l'hôte et l'attaque physique par une ramification et un enroulement intenses autour des hyphes de l'hôte, avec la possibilité de former des structures de pénétration de type appressoria, homologues des appressoria pathogènes.

### *Mécanisme influençant la production de mycotoxines*

Les mycotoxines sont produites par les souches de *Fusarium* pour faciliter la colonisation des tissus végétaux mais aussi pour se défendre contre d'autres micro-organismes qui partagent le même environnement, affectant directement le comportement des agents de biocontrôle (Lutz et al., 2003). Réciproquement, les BCA ont développé des stratégies pour combattre ce trait de virulence des pathogènes, comme l'inhibition de l'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des toxines (action suppressive) ou la métabolisation de ces molécules, ce qui permet de réduire leur quantité et/ou toxicité. Ces événements concernent par exemple *Clonostays rosea* qui inhibe des voies de biosynthèse des mycotoxines de *F. verticillioides* (Samsudin et Megan, 2016), ou *Pseudomonas* spp. qui est apte à bloquer la synthèse des DON en modifiant l'acétylation des histones (Chen et al., 2018).

La métabolisation et la détoxification des mycotoxines sont liées à des phénomènes de dégradation enzymatique de modification ou de fixation des toxines. C'est le cas par exemple des bactéries lactiques, ou des champignons des genres *Rhizopus*, *Aspergillus* et *Penicillium* spp. (Gromadzka et al., 2009).

Les agents de lutte biologique les plus efficaces sont ceux qui combinent plusieurs mécanismes différents pour contrôler les agents pathogènes (Pal et Gardener, 2006).

### *Élicitation des défenses végétales*

Les agents bénéfiques, quels que soit leurs clades taxonomiques, restent des organismes dont les diversités moléculaires qui les constituent sont remarquablement riches. Les végétaux ont la capacité d'en lire certains éléments biochimiques, comme des protéines, des lipides ou des oses. La reconnaissance de ces éléments par des récepteurs induit des cascades de signalisation complexe chez l'hôte qui lui permettent de répondre de manière appropriée, certes cellulièrement mais aussi dans tout ou partie de l'organisme, pour contrer le processus infectieux de potentiels pathogènes. Ces réponses physiologiques, inhérentes aux performances immunes végétales, sont un levier supplémentaire puissant et efficace que les plantes déploient pour combattre leurs pathogènes.

Les défenses qui établissent les bases d'une résistance locale et/ou généralisée de l'individu sont très complexes, autant dans les processus initiaux de reconnaissance que ceux plus tardifs dans l'interaction et qui correspondent à la biosynthèse et à la sécrétion de molécules potentiellement toxiques pour le pathogène.

Parce que les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'élicitation et l'accumulation des défenses végétales sont très riches et que nous avons investi beaucoup d'effort dans leur étude, nous les traitons en détail dans la section suivante.

## **IV. L'immunité innée chez les végétaux - généralités**

### **IV.1. Généralités**

Dans leur environnement naturel, les plantes sont confrontées à de nombreuses fluctuations spatio-temporelles, de causes abiotiques (température, hydrométrie, mécanique, salinité, pollution, carence, luminosité) ou biotiques (agents et particules vivants), et dont les sévérités, les superpositions et les récurrences sont aléatoires. Les contraintes biotiques résultent de l'action directe de particules vivantes (virus, viroïdes) ou d'organismes vivants (bactéries, mycètes, nématodes, plantes, insectes mammifères) sur un organisme vivant appelé hôte.



Les agents virulents sont caractérisés par une hétérotrophie au carbone et une aptitude à coloniser leur hôte. Ils sécrètent différentes classes de molécules liées à leur pathogénicité (toxines, facteurs de virulence, etc.). Ils affectent alors profondément les performances physiologiques des cellules de l'hôte à leur contact, puis en tout ou partie de la plante, ce qui se traduit classiquement par un ralentissement de la croissance de l'organisme ou sa mort.

En dépit de leur grande vulnérabilité apparente, la maladie chez les végétaux reste l'exception car, au cours d'une longue évolution et pour s'opposer à ces contraintes multiples, les plantes ont développé plusieurs stratégies de mécanismes de défense. Les niveaux de réponses de ces mécanismes sont étroitement dépendants de leur performance physiologique immune (*ie* l'immunité innée).

Les végétaux, à la grande différence du monde animal, sont dépourvus de cellules immunitaires spécialisées dans la protection de l'organisme. Ainsi, chaque cellule prise individuellement est apte à déclencher une réponse immunitaire. Toutefois, des spécificités de défenses peuvent être observées entre différents types de cellules. Mais, ces cellules déploient généralement une batterie de défenses permettant de détecter et d'arrêter les pathogènes envahisseurs avant qu'ils ne soient en mesure de causer des dommages physiologiques importants. Deux classes de défenses se superposent : i) les défenses constitutives qui sont déterminées par des facteurs préexistants avant tout contact avec l'agent pathogène (*ie* barrières morphologiques et chimiques), tels que les cuticules et les parois pectocellulosiques épaisses, les dépôts de silices et de polyphénols cristallisés, les épines, et les poils urticants. Les défenses induites sont en revanche déployées dès lors que le pathogène franchit les mécanismes de défenses passives et que ses signatures moléculaires sont identifiées (*ie* barrières chimiques principalement), avec la sécrétion de métabolites secondaires, de protéines toxiques, de phytohormones de signalisation de stress, etc. L'ensemble de ces défenses est contrôlé par un réseau moléculaire complexe. Il implique plusieurs gènes (*ie* résistance polygénique), mais dont les expressions sont temporelles, précoces à tardives, lors de l'interaction, recouvrant ainsi tous les mécanismes cellulaires qui surviennent depuis la détection de l'agent pathogène jusqu'à l'arrêt de son activité pathogénique.

#### **IV.2. La résistance, un événement spatio-temporel pluriel**

La résistance, lorsqu'elle est élicitée, correspond à une réponse cellulaire générale. Elle se décompose en trois temps forts :

- *Des réponses très précoces* : qui se déroulent quelques minutes après la reconnaissance des éliciteurs. Ces réponses se manifestent séquentiellement par des flux ioniques à travers la membrane plasmique (influx d'ions calcium et de protons, et efflux d'ions potassique et chlorique), l'activation des voies de transduction de signaux (protéines G, kinases, etc.), et la production de ROS
- *Des réponses intermédiaires* : accumulation forte de défenses, épaissement pariétaux, émission de phytohormones de stress, et réaction d'hypersensibilité (« *Hypersensitive Reaction* », HR)
- *Des réponses tardives* : qui s'adressent aux tissus contigus (LAR) et dans tout ou partie de la plante (SAR). Des accumulations de défenses et des émissions de phytohormones de stress sont également enregistrées mais avec des quantités moindres voire infinitésimales

#### IV.2.1. La réaction d'hypersensibilité (HR)

La résistance est un processus physiologique cellulaire résultant d'ajustements rapides et profonds. Ces ajustements s'opèrent à l'échelle moléculaire. Une des manifestations de défenses actives observable à l'œil nu, est la réaction d'hypersensibilité (HR). Cette réaction cellulaire spécifique s'explique par le concept (ou modèle) gène-pour-gène, émis par Flor sur le pathosystème *Lin/Melampsora lini*, et dans laquelle le produit du gène de résistance de la plante reconnaît le produit du gène d'avirulence émis par le pathogène (spécificité par affinité structurale intermoléculaire) (Flor, 1971).

Cette réaction cellulaire est brutale, intense et de très courte durée. Elle se manifeste par l'autodestruction ultime d'un nombre limité de cellules hôtes en contact direct avec le pathogène. Néanmoins, avant de s'effondrer définitivement, ces cellules activent la synthèse de molécules de défense antimicrobienne (phytoalexines, protéines liées à la pathogénie ou protéines PR, etc.) aux actions directe et/ou indirecte. Ces premières lignes de défense sont généralement très efficaces pour circonscire rapidement et durablement le pathogène au site d'infection ou, à défaut, de ralentir son activité infectieuse dans l'organisme (multiplication, et migration/infection intra- et inter-plantes).

La HR résulte néanmoins de l'activation combinée de deux mécanismes moléculaires majeurs : i) une nécrose cellulaire *stricto sensu*, et ii) une mort cellulaire programmée (ou PCD, « *Programmed Cell Death* »). La nécrose cellulaire est provoquée par une rapide explosion oxydante, encore nommée choc oxydant ou choc respiratoire. Elle se déroule au site de contact des protagonistes. Elle se caractérise par une très forte augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'apoplasme, quelques minutes après l'interaction entre les protagonistes. Ces ROS dérivent de réductions successives de l'oxygène moléculaire  $O_2$  (Baker et Orlandi, 1995). Dans les interactions plantes-micro-organismes, les ROS les plus souvent étudiées sont  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $HO_2^{\cdot}$  et  $H_2O_2$ . Ces productions sont notamment assurées par l'activation d'enzymes localisées dans les membranes cellulaires ou les parois, comme les NADPH oxydases (encore appelées RBO pour « *Respiratory Burst Oxydase* »), les Peroxydases, les Lipoxygénases et les Oxalate oxydases. La toxicité de ces molécules réside dans leur haute réactivité spontanée, notamment avec les doubles liaisons de toutes molécules, quelle que soit la famille biochimique. A ce titre, leur action dans le cadre d'une réponse précoce est directe et non spécifique, en ce sens que, par exemple,  $H_2O_2$  en forte concentration inhibe la germination de spores de plusieurs champignons pathogènes. Cependant, la non-spécificité réactionnelle de ces ROS engendre également des répercussions irréversibles sur les cellules du végétal qui les produisent. A fortes concentrations, les homéostasies d'oxydoréduction ainsi que les systèmes antioxydants des cellules submergées (eg Catalases, Superoxyde dismutases, enzymes du cycle Halliwell-Asada-Foyer (HAF, ou cycle ascorbate-glutathion) sont profondément impactées, et des métabolites secondaires comme le glutathion, l'ascorbate, certains flavonoïdes, le tocophérol et les caroténoïdes sont synthétisés (Quan et al., 2008 ; Gadjev et al., 2008). Par voie de conséquence, ces ROS réagissent en premier lieu avec les acides gras insaturés des lipides membranaires, provoquant leur peroxydation et *in fine* leur dégradation. La lipo-peroxydation des membranes aboutit à la déchirure de celles-ci, précisément au lieu de contact des protagonistes.

La réactivité spontanée des ROS peut être potentialisée sous l'action des Peroxydases. Ces enzymes polymérisent de nombreux constituants pariétaux et participent ainsi au renforcement des barrières physiques extracellulaires.

En parallèle, les cellules enclenchées dans un processus de HR amorcent quasi-simultanément les mécanismes apoptotiques (*ie* la mort cellulaire programmée ou PCD). Ce dernier phénomène stoppe très rapidement les métabolismes énergétiques de la cellule et déclenche l'auto-dégradation des constituants cellulaires (ADN, ARN, protéines, etc.) tout en activant les flux cytosoliques intercellulaires (*via* les plasmodesmes). Ce dernier événement diminuerait significativement la turgescence cellulaire des cellules infectées, ce qui, par voie de conséquence, abaisserait les niveaux d'épanchements cytosoliques vers l'apoplasme (c'est à dire le territoire infecté), limitant ainsi tout approvisionnement en eau, minéraux et molécules organiques du pathogène.

#### **IV.2.2. Généralisation de la résistance à travers la plante**

La HR n'est pas systématiquement observée, comme c'est le cas avec certains pathosystèmes incompatibles ; *Arabidopsis* résiste à *Erysiphe cichoracearum* ou à *X. campestris* sans induction de nécroses cellulaires (Parker et al., 1993 ; Adam et Sommerville, 1996). Cependant, elle constitue toutefois le premier événement cellulaire majeur de la résistance générale des végétaux. Outre le fait de contenir les pathogènes sur les sites infectieux, les cellules développant la HR émettent également des signaux d'alerte vers les cellules contiguës. Ces signaux sont pluriels, et correspondent à l'émission de molécules de signalisations (tel  $H_2O_2$ ), ou de phytohormones spécifiques, solubles et/ou gazeuses et appartenant à différentes familles moléculaires comme les salicylates, les jasmonates, ou l'éthylène.

Dans un contexte spatio-temporel,  $H_2O_2$  en faibles concentrations est considéré être une molécule liée à des voies de signalisations intra- et intercellulaires spécifiques. Ces voies sont potentiellement impliquées dans l'élicitation des mécanismes de défense plus « tardifs », comme par exemple l'activation des gènes codant les protéines PR ou des enzymes impliquées dans l'accumulation de phytoalexines et de divers métabolites secondaires toxiques (Podgórska et al., 2017). En effet,  $H_2O_2$  est capable de diffuser spontanément à travers les bicouches lipidiques des membranes biologiques. Cependant, sa diffusion est modulée par des canaux qui appartiennent à la superfamille des « *Major Intrinsic Proteins* » (MIP) ou aquaporines (AQP). A ce titre, ces canaux sont nommés peroxyporines (Bienert et Chaumont, 2014). La transcription des gènes codant ces canaux est d'ailleurs activée lors des interactions plantes/micro-organismes, et l'accumulation des protéines apparentées semble jouer un rôle clé dans l'établissement de la résistance végétale (Li et al., 2020).

Quoi qu'il en soit, toutes ces molécules signaux ( $H_2O_2$  et phytohormones) sont rapidement synthétisées et sécrétées dans l'apoplasme. Elles agissent de concert, et dans des équilibres très fins et complexes. En premier lieu, elles sont alors responsables de l'induction d'une zone de résistance locale acquise (« *Local Acquired Resistance* », LAR), qui est contiguë à celle développant la HR. Ces territoires cellulaires ainsi élicités synthétiseront à leur tour des molécules de défenses, souvent identiques à celles produites par les cellules développant la HR mais à des niveaux d'accumulation moindres et non létales. De même, ces territoires synthétiseront ces mêmes phytohormones de stress qui, au côté de celles produites par des cellules développant la HR, participeront à

la propagation des signaux de stress dans tout ou partie de la plante. Il en résulte une élicitation généralisée ou systémique des mécanismes de défenses, encore appelée résistance systémique acquise (« *Systemic Acquired Resistance* », SAR). LAR et SAR présentent des niveaux de résistance moins intenses, mais plus durables dans le temps. Les plants seraient ainsi immunisés contre toute nouvelle attaque éventuelle du pathogène incriminé ou de tout autre agresseur opportuniste, avec notamment l'aptitude de pouvoir répondre plus rapidement et fortement (Kauffmann et al., 2001). Mais quel que soit le type de résistance (HR, LAR ou SAR), ils se décomposent en trois phases principales : i) la reconnaissance moléculaire, ii) l'accumulation de défenses, puis iii) l'amplification des voies de signalisation par émission de messagers secondaires tels que les phytohormones.

Afin de tenir compte de la pluralité des interactions qui aboutissent à la mise en place des événements de résistance, deux types de résistance systémique peuvent être nuancés : i) la SAR et ii) la RSI ou ISR (respectivement Résistance Systémique Induite ou « *Induced Systemic Resistance* »). Ces réponses immunes SAR et ISR sont phénotypiquement similaires. Cependant, elles diffèrent par leurs voies d'induction et les défenses mises en jeu (Vlot et al., 2021). La SAR est directement déployée par la reconnaissance d'un pathogène avirulent. Elle ferait intervenir l'acide salicylique et des protéines liées à la pathogénicité (ou protéines-PR pour « *Pathogenesis-Related Proteins* »). Quant à l'ISR, elle serait stimulée par des agents infectieux nécrotrophes, ou des agents non infectieux commensaux ou bénéfiques appelés génériquement PGPM (« *Plant Growth Promoting Microorganisms* ») (Pieterse et al., 2014). Ces organismes sont souvent des endophytes, mais certaines espèces évoluent également à l'extérieur des tissus végétaux au sein de communautés microbiotiques. Les signaux hormonaux participant à l'établissement de l'ISR concerneraient plutôt les familles des jasmonates et l'éthylène, et des défenses induites seraient plus de type phytoalexines.

#### **IV.2.3. Les messagers hormonaux impliqués dans l'immunité innée des végétaux**

A l'instar de n'importe quelle fonction physiologique, des équilibres phytohormonaux spécifiques pilotent l'établissement des relations parasitaires. Quelques familles de phytohormones seraient donc impliquées dans l'expression des résistances végétales, et elles agissent de manière finement coordonnée et régulée. Cependant, des spécificités existent pour chacune d'elle.

Il est couramment présenté que les voies de l'acide salicylique seraient indépendantes de celles de l'acide jasmonique et de l'éthylène (voie JA/Et). Une infection par un pathogène biotrophe, qui se développe au détriment de cellules hôtes vivantes, provoquerait principalement l'activation des voies dépendantes de SA. Tandis qu'une infection provoquée par un pathogène nécrotrophe et qui se développe initialement sur des tissus vivants puis les tue à un stade relativement avancé au cours de leur processus infectieux, la reconnaissance d'un PGPM ou une blessure induiraient des réponses de défense impliquant les voies dépendantes des équilibres JA/Et. Selon la contrainte appliquée, la composition des composés défensifs synthétisés varie en fonction des voies de signalisation mises en jeux. Cependant, les équilibres phytohormonaux sont très subtils et les interconnexions des voies éminemment complexes.

Globalement, les voies dépendantes du SA semblent avoir une certaine priorité sur celles impliquant les équilibres JA/Et, avec de possibles inhibitions des réponses de défense induites par ces dernières (Pieterse et al., 2014 ; Shigenaga et al., 2017). En revanche, les voies JA/Et dépendantes auraient un effet positif (synergique) sur l'action des voies SA dépendantes. L'activation simultanée de la SAR et de l'ISR peut conduire à une résistance contre les maladies plus importante que chacune d'elle exprimée séparément (van Wees et al., 2000). Tandis que la SAR protégerait la plante sur plusieurs semaines contre de nouvelles infections (quel que soit l'agent pathogène), l'ISR ne conférerait qu'une protection totale sur quelques jours. Enfin, la durabilité de la résistance induite par les PGPM varie selon la plante, les souches de PGPM utilisées et les organes sur lesquels ils sont appliqués (Ramamoorthy et al., 2001 ; Harman et al., 2004).

Les messagers secondaires sont le résultat de l'activation précoce de gènes codant les enzymes clés des voies de biosynthèse correspondantes. Ils jouent un rôle dans l'induction des résistances locale et systémique acquises en activant à leur tour des gènes de défense « tardifs » ainsi que dans la production d'une diversité remarquable de composés issus de différents métabolismes secondaires, comme des protéines de défense (protéines PR) et diverses phytoalexines.

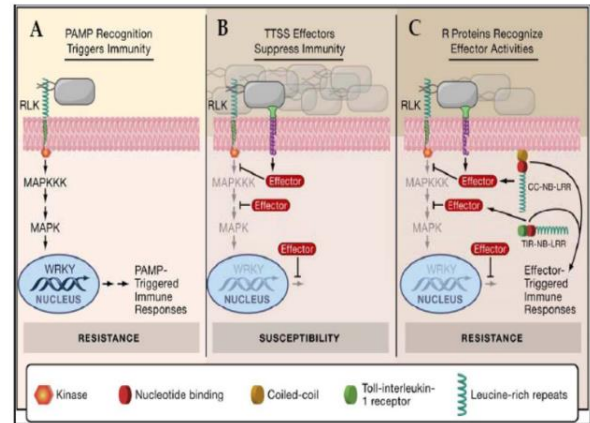
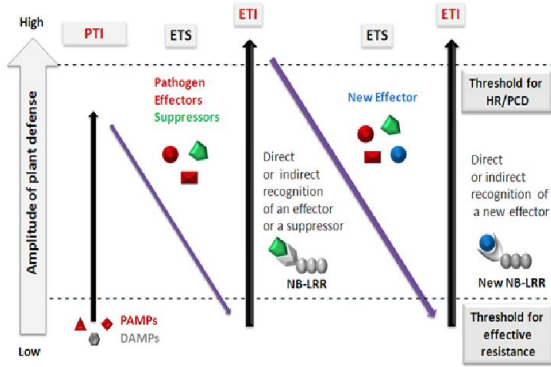
### **IV.3. La résistance, une série de mécanismes moléculaires très riches**

#### **IV.3.1. Reconnaissance de l'agent pathogène**

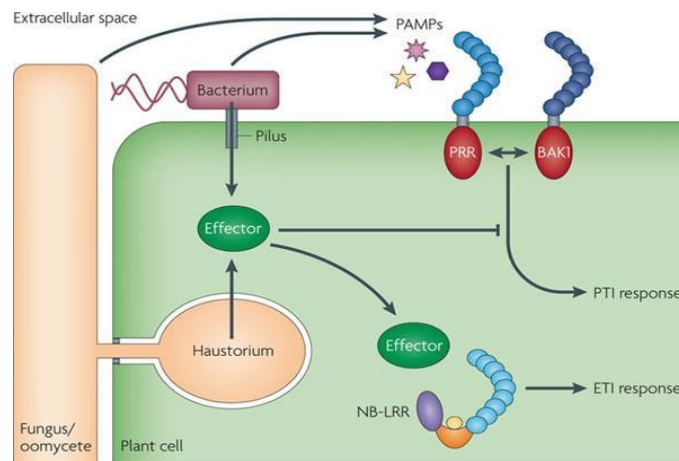
La perception d'un agent pathogène implique la reconnaissance d'un éliciteur (ce terme a pour origine étymologique le verbe anglais « *to elicit* » : provoquer). Les plantes possèdent deux lignées de protéines qui provoquent les défenses. La première est constituée de récepteurs de surface cellulaire. Leur structure particulière et très conservée est de type « récepteur kinase ». Elle permet de percevoir des signatures moléculaires relativement communes et peu spécifiques présentes à la surface ou sécrétées par de nombreuses espèces d'un micro-organisme. Ces motifs sont appelés MAMP ou PAMP (« *Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns* ») et conduisant à une voie de résistance spécifique qualifiée de « *PAMP Triggered Immunity* » (PTI) (Jones et Dangl, 2006). Cette réponse est de faible intensité mais suffisante pour freiner, voire annihiler la progression du pathogène.

Cette voie PTI peut être toutefois surmontée si le pathogène secrète des effecteurs de virulence qui lui permettent de poursuivre sa colonisation, et d'affaiblir à nouveau la plante. On parle alors de sensibilité déclenchée par des effecteurs ou ETS (« *Effector Triggered Susceptibility* ») (Li et al., 2013). Ces effecteurs de virulence altèrent cette PTI en interférant par exemple avec l'étape de reconnaissance des PAMP ou les étapes de signalisation (transduction du signal) en aval de cette reconnaissance. Dans une dynamique évolutive entre protagonistes, la plante peut en réponse développer une seconde voie de défense très spécifique vis-à-vis d'isolats particuliers, et qui résulte de son aptitude à reconnaître ces ETS par une deuxième vague de défense intracellulaire ; cette voie correspond à l'immunité déclenchée par les effecteurs ou ETI (« *Effector Triggered Immunity* »). L'ETI confine la colonisation des tissus par un pathogène au site initial de l'infection.

La PTI intervient dans les phénomènes de résistance basale et de résistance « non-hôte » ou élicitee par des agents non pathogènes tels les PGPM. Quant aux voies ETI,



**Figure 24. Le modèle « Zigzag » dans les interactions plante/pathogène** (Jones et Dangl, 2006). Les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) et les motifs moléculaires associés aux cellules végétales endommagées (DAMP) déclenchent l'immunité PAMP (PTI), et selon les pathosystèmes, une hypersensibilité (HR) (partie A de la figure). Les effecteurs de pathogénie (ETS) secrétés par les pathogènes contribuent à la sensibilité de l'hôte (partie B de la figure). Les plantes émettent alors des protéines de résistance (NB-LRR) qui détectent les ETS, en déclenchant l'immunité ETI (partie C de la figure). L'amplitude de la défense est indiquée sur l'ordonnée de la Figure 24. (Zvereva et Pooggin (2012) adapté et complété à partir du modèle de Jones et Dangl (2006)).



**Figure 25. Modèle de Dodds et Rathjen du système immunitaire des plantes** (Dodds et Rathjen, 2010). La première stratégie de défense débute dans l'espace extracellulaire, où des motifs associés aux pathogènes (PAMP) sont reconnus par les récepteurs de la plante (PRR), instruisant l'immunité déclenchée par les PAMP (PTI). Ces PRR sont constitués d'un domaine extracellulaire (bleu) et d'un domaine kinase intracellulaire (rouge). La seconde stratégie est intracellulaire, après que le pathogène ait pénétré les parois cellulaires de l'hôte mais pas la membrane plasmique. Les bactéries sécrètent des effecteurs dans la cellule hôte par un pilus de sécrétion, tandis que les mycètes utilisent des haustoria ou des hyphes invasifs. Ces effecteurs peuvent inhiber la PTI mais aussi être reconnus par les récepteurs NLR intracellulaires, ce qui induit une immunité déclenchée par l'effeteur (ETI).

elles concerneraient les résistances « hôtes ». Elles seraient finalement très précaires au cours du temps, surtout pour les plantes issues de processus de domestication (comme le blé) qui ont subi une érosion génétique de leur performance immune générale.

Il est important de préciser que ces molécules élicitrices ne sont pas exclusives aux micro-organismes, car certaines émanent du végétal infesté. Ces éliciteurs endogènes ont été baptisés DAMPs (« *Damage-Associated Molecular Pattern* »). Ils incluent des molécules du végétal très diverses et qui, à l'instar des MAMP et PAMP, jouent un rôle de signal primaire. Ils concernent par exemple des oligo- $\alpha$ -galacturonides provenant de la dégradation de la paroi végétale par des enzymes hydrolytiques fongiques, ou des peptides initialement synthétisés dans la cellule végétale et qui vont être libérés lorsque les cellules seront lésées (*eg* les systémines chez la tomate ou AtPEP1 chez *A. thaliana*).

Les phases successives et coévolutives des événements de reconnaissances entre les plantes et micro-organismes correspondent donc à la PTI, l'ETS, l'ETI, incluant de possibles alternances entre les ETS et ETI. Cette dynamique moléculaire résulte du contournement par le bioagresseur des gènes de résistance de la plante hôte, et cette dernière, par pression de sélection (et de survie) évoluera dans ses aptitudes de reconnaissances. L'ETI se caractérise par des réponses plus fortes, plus rapides et plus localisées, généralement comparées à la PTI. L'ETI aboutit le plus souvent à l'élicitation d'une HR, localisée au niveau de l'infection. Le modèle en « *zigzag* », décrit par Jones et Dangl (2006) (**Figure 24**), illustre cette alternance moléculaire au cours du temps entre les déterminants de la virulence des micro-organismes et les déterminants de la résistance des plantes attaquées (schématisés dans la **Figure 24B**). Il instruit les interactions incompatible et compatible entre les plantes et des micro-organismes potentiellement pathogènes.

Même si ce modèle en *zig-zag* expliquant le système immunitaire des plantes est largement répandu, il révèle toutefois certaines limites. Dans ce modèle, la défense de la plante n'est considérée que comme une composante globale où les variables PTI et ETS se soustraient et auxquelles s'ajoute la variable ETI. De plus, ce modèle ne précise pas les unités de réponse utilisées ni la valeur finale. De même, ce modèle est basé sur des microbes biotrophes et n'est pas adapté à des pathogènes ou insectes nécrotrophes. Une dernière limite serait que le modèle en *zig-zag* est linéaire, où les interactions se succèdent et n'incluent pas les possibles combinaisons d'interactions (ayant lieu simultanément) ni la différence dans le nombre et l'origine de ces interactions.

Le modèle émis par Dodds et Rathjen (2010) apparaît ainsi plus pertinent (**Figure 25**). Il expose les deux stratégies que la plante développerait pour détecter des pathogènes et leurs principaux acteurs. Ces deux stratégies impliquant i) des récepteurs PRR qui reconnaissent les éliciteurs PAMP extracellulaires et dont les événements de reconnaissances conduisent à l'ITP, et ii) des récepteurs NLR intracellulaires qui induisent cette même ITP après la reconnaissance des effecteurs sécrétés dans le cytosol de l'hôte. L'absence de linéarité dans ce modèle démontre que ces deux stratégies fonctionneraient séparément, successivement, ou même simultanément selon les pathosystèmes ou les interactions positives mises en jeu.

Quels que soient les récepteurs impliqués lors d'une interaction, l'élicitation d'une réaction immunitaire chez la plante nécessite un transfert rapide du signal d'alarme (l'identification de l'agent pathogène) jusqu'aux systèmes de régulation de la transcription des gènes de défenses. La transduction de ce signal est assurée par

Family	Size (kDa)	Member	Properties
PR-1 <sup>a</sup>	15	Tobacco (PR-1a)	Antifungal
PR-2	30	Tobacco (PR-2)	$\beta$ -1,3-glucanases
PR-3	25–30	Tobacco P, Q	Chitinases (I, II, IV, V, VI, VII)
PR-4	15–20	Tobacco R	Chitinases (I, II)
PR-5	25	Tobacco S	Thaumatine-like proteins (TLPs)
PR-6	8	Tomato inhibitor I	Proteinase inhibitor
PR-7	75	Tomato P <sub>69</sub>	Endoproteinase
PR-8	28	Cucumber chitinase	Chitinase (III)
PR-9	35	Tobacco (lignin-forming peroxidase)	Peroxidase
PR-10	17	Parsley (PR-1)	Ribonuclease-like proteins (RLP)
PR-11	40	Tobacco class-V chitinase	Chitinase (I)
PR-12	5	Radish RsAFP3	Defensin
PR-13	5	<i>Arabidopsis</i> Thi2.1	Thionin
PR-14	9	Barley LTP4	Lipid-transfer protein (LTP)
PR-15	20	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase (OXO)
PR-16	20	Barley OxOLP	Oxalate oxidase-like (OXO)
PR-17	27	Tobacco PRp27	Antiviral and antifungal

**Tableau 4. Classification des protéines PR (Moosa et al., 2017).**



l'activation rapide de cascades de signalisation, faisant intervenir plusieurs familles de protéines kinases, comme par exemple les MAPK (« *Mitogen Activated Protein Kinases* ») ou des Protéines Kinases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , ainsi que des phosphatases. L'ensemble de ces événements de reconnaissance et de transduction des signaux permet soit de renforcer les défenses constitutives soit de lancer la biosynthèse de nouvelles défenses prévenant alors la propagation du pathogène.

Les qualité et spécificité de ces dialogues moléculaires entre les protagonistes inscrivent l'interaction soit dans un contexte de compatibilité (maladie), soit d'incompatibilité (résistance).

#### **IV.3.2. Les réponses de défenses à l'infection**

Dès que la plante est attaquée et ses processus de reconnaissance déclenchés, des protéines enzymatiques et non enzymatiques voient leur transcription et/ou traduction, et/ou encore leurs activités intrinsèques, modulées. En ce qui concerne les enzymes, elles participent à la synthèse de métabolites secondaires très diversifiés, qu'ils soient absents dans les tissus avant l'attaque ou déjà présents et dont leur concentration constitutive est alors augmentée. Ces composés permettent i) de renforcer les parois cellulaires de l'hôte par imprégnation de lignine, de subérine, de callose ou de petites glycoprotéines riches en prolines (PRGP) ou en hydroxyprolines (HRGP), et ii), d'augmenter les concentrations en molécules aux actions antimicrobiennes directe comme les phénylpropanoïdes, sesquiterpénoïdes, composés cyanogéniques, etc. La finalité de ces réactions est d'assurer le blocage du développement de l'agent infectieux dans les délais les plus brefs.

##### **IV.3.2.1. Les protéines PR**

Une classe de protéines particulières est précocement et très fortement induite dans des conditions pathologiques : les protéines PR (« *Pathogenesis-Related proteins* »). Les protéines PR constituent un groupe de protéines végétales structurellement diverses. Elles sont toxiques pour les organismes pathogènes comme les mycètes et bactéries. Elles sont largement répandues dans les plantes saines à l'état de traces. Cependant, elles sont produites en concentration beaucoup plus élevée en réponse à une attaque par un pathogène, initialement dans les zones infectées, puis de manière systémique. Ces protéines PR s'accumulent dans les espaces intracellulaires et/ou les espaces extracellulaires, en particulier dans les parois cellulaires des différents tissus.

Les protéines PR présentent une diversité élevée. Différents groupes de protéines PR ont été déterminés en fonction de leur identité de séquence et de leurs propriétés biochimiques et enzymatiques. Les protéines PR sont soit extrêmement acides, soit extrêmement basiques, et sont donc très solubles et réactives. Dix-sept familles de protéines PR sont reconnues à ce jour. Plusieurs groupes de protéines PR ont des fonctions biologiques bien déterminées et directes sur les micro-organismes (**Tableau 4**). Par exemple, les protéines PR-2 ( $\beta$ -1,3-glucanases), et PR-3, -4 -8 et -11 (Chitinases) sont des enzymes capables de dégrader la paroi des champignons et des bactéries. Les protéines PR-1, PR-5 (Thaumatine), PR-14 (Protéine de transfert des lipides, LTP) et les petits peptides PR-12 (défensines) et PR-13 (thionines) agiraient au niveau de la membrane des micro-organismes, notamment fongiques.

En revanche, certaines protéines PR développeraient des activités indirectes sur les micro-organismes, comme les PR-9 (Peroxydases) dans le renforcement de la paroi, ou les PR15 et -16 (Oxalate oxydases) qui oxydent l'oxalate pour générer de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>. Enfin, certaines présentent des fonctions putatives ou encore inconnues, bien que leur toxicité ait été démontrée, comme par exemple les PR-1 (anti-oomycètes et antifongiques), PR-10 (Ribonucléase) et PR-17 (antiviral et antifongique). Outre leur rôle fonctionnel dans les défenses des végétaux, ces protéines PR sont couramment utilisées comme marqueurs des réactions de défense. Ainsi la protéine PR1 serait un marqueur de la HR et de la SAR, et donc des réponses impliquant les voies SA-dépendant, ou les défensines (PR-12) seraient des marqueurs des réponses cellulaires dépendantes des voies du JA et de l'Et (Thomma et al., 1999 ; Tierens et al., 2002).

#### **IV.3.2.2. Les phytoalexines**

De nombreux composés « antimicrobiens » nommés phytoalexines sont synthétisés lors de l'attaque. Ces molécules, de faibles poids moléculaires, sont représentées par des structures et des fonctions biologiques remarquablement diversifiées. La diversité de ces métabolites dans le règne végétal est estimée entre 200 000 et un million (Dixon et Strack, 2003 ; Bino et al., 2004). Cette diversité serait probablement le résultat de mécanismes d'adaptation génétique des plantes à leur environnement qui est perpétuellement fluctuant, y compris aux réponses aux contraintes abiotiques et biotiques (Bednarek et Schulze-Lefert, 2009).

Ces métabolites secondaires sont classés en sept classes majeures, et ce en fonction des voies métaboliques auxquelles ils sont rattachés : les phénypropènes, les terpènes, les flavonoïdes, les polyacétylènes, les indoles, les glucosinolates, et les benzènes (Bednarek et Osbourn, 2009).

La structure chimique de ces métabolites est souvent caractéristique d'une famille végétale : les isoflavonoïdes chez les Fabaceae, les sesquiterpénoïdes chez les Solanaceae, les polyacétylènes chez les Asteraceae, les diterpènes chez les Poaceae, etc. (Lepoivre, 2003). Mais en règle générale, il existe une corrélation étroite entre l'ampleur et la vitesse de leur accumulation dans un tissu végétal et l'inhibition du développement des micro-organismes infectieux. Enfin, de part la nature globalement hydrophobe de la majorité d'entre eux, leur accumulation s'opère dans des vésicules de sécrétions spécifiques qui sont véhiculées juste au niveau du site d'interaction entre la cellule végétale et le pathogène. Certes toxique pour les parasites, ces phytoalexines le sont tout aussi à forte concentration pour les cellules élicitées qui les produisent (Kobayashi et al., 1995). Leur accumulation spatialement ciblée au cours de la réaction d'hypersensibilité participe au processus déclencheur du collapse nécrotique des cellules hôtes et, ultimement, à leur libération massive au niveau des sites de rupture des membranes plasmiques (*ie* lieu des épanchements cytosoliques), résultat des événements de lipo-péroxydation membranaire ROS-dépendant susmentionnés.

#### **IV.4. Défenses végétales et objectifs de la thèse**

Les défenses végétales sont très diverses et leur modulation découlent de réponses cellulaires à une contrainte, qu'elle soit abiotique ou biotique (voire émanant de signaux intrinsèques à la plante, comme lors des processus de croissance, division cellulaire, reproduction, germination, etc.).

Dans notre étude, plusieurs modalités d'interaction sont explorées :

- i) Un pathosystème fongique compatible (aboutissant à la maladie) avec les protagonistes blé-*F. culmorum*
- ii) Des interactions « bénéfiques ou positives » entre le blé et des *Trichoderma* spp. et des rhizobactéries
- iii) Enfin, des interactions tripartites confrontant le pathosystème compatible blé-*F. culmorum* et les micro-organismes bénéfiques

Il est impossible de préjuger des défenses qui seront induites ou réprimées par les micro-organismes, qu'ils soient pathogènes ou bénéfiques, sur les variétés de blé que nous utilisons. Cependant, nous émettons l'hypothèse que les réponses de défenses induites dans le pathosystème compatible devraient se singulariser de celles observées avec les interactions bénéfiques. Mais qu'en sera-t-il pour les interactions tripartites, tout particulièrement dans un contexte où les micro-organismes bénéfiques auraient l'aptitude d'induire la résistance chez le blé pourtant infesté par *F. culmorum* ?

Quelques données bibliographiques ont montré des mécanismes moléculaires liées aux réponses de maladie chez le blé lors d'une infestation fusarienne ou à l'établissement des performances immunes induites par des agents bactériens ou fongiques bénéfiques. Notre souhait est d'éclairer spécifiquement dans ces différentes modalités d'interaction certains des mécanismes moléculaires qui corrèleraient avec les résistances que nous observerions. Ces défenses expliqueront une part des résistances recouvrées, et pour ce faire, une large série d'entre elles sont ici étudiées. Elles recouvrent les mécanismes de reconnaissance (récepteur) et de signalisation cellulaire (kinase et facteur de transcription), le stress oxydant, l'accumulation de défenses (protéines PR et métabolites secondaires) et les balances phytohormonales inhérentes aux voies de SA et de JA-Et.

Le processus de résistance met en jeu un réseau moléculaire spatio-temporel éminemment riche. A cet égard, nous n'aurons pas la prétention d'expliquer les résistances observées au travers de la modulation de quelques voies de défenses végétales. Néanmoins, leur étude n'en sera pas moins très enrichissante et, à cet égard, certaines défenses seront considérées comme des marqueurs moléculaires pertinents et potentiellement valorisables dans les processus de sélection variétale.



**Objectifs  
et  
Démarche de la thèse**

Ma thèse s'inscrit dans une dynamique agronomique très actuelle et stratégique : caractériser une communauté microbienne en interaction avec une variété ancienne de blé (*Florence Aurore*, variété INRA datant de 1936) afin d'en isoler quelques souches « bénéfiques » qui seront alors valorisées sur des variétés modernes de blé (Khlar et Karim) couramment semées en Tunisie. L'objectif est de tirer parti de leurs potentiels *Plant Growth Promoting Microbes* (PGPMs) et d'*agents de biocontrôle* (BCA) contre *Fusarium culmorum*, un des agents responsables de la fusariose chez le blé.

Les communautés bactérienne et fongique que nous ciblons évoluent au niveau des racines, des épis et de la rhizosphère du sol. La valorisation des potentiels PGPMs et BCA de certains membres de ces communautés participera à l'élaboration de solutions efficaces, ambitieuses et pertinentes pour le développement d'une agriculture durable qui garde le cap de toujours produire « plus et mieux » tout en préservant l'environnement en général, et en particulier nos agrosystèmes et la santé des producteurs et consommateurs.

Ce sujet de thèse s'inscrit pleinement dans l'élaboration des plans stratégiques d'optimisation des moyens de luttés phytosanitaires afin qu'ils soient naturels et respectueux de l'environnement. Nos intentions sont que nos résultats participent à alimenter les réflexions en cours et menées pour contenir l'expansion et/ou l'agressivité des bioagresseurs qui sévissent sur le blé. Conscient que cette tâche est immense, multi-échelle et multidisciplinaire, notre approche est encore essentiellement fondamentale, c'est-à-dire que toutes nos expérimentations ont été menées en milieu axénique ou en chambre de culture (hors champs donc), et les mécanismes sous-jacents des interactions qu'établissent ces micro-organismes avec leur hôte (le blé) ont été exhaustivement étudiés au niveau moléculaire. La finalité de ma thèse est de participer à la sélection de souches fongiques et bactériennes pour leurs aptitudes à bio-stimuler diverses fonctions physiologiques chez le blé, *ie* la croissance et l'immunité innée générales, des aptitudes qui, nous espérons, seront observées en plein champs pour réfléchir à leur valorisation appliquée à grande échelle.

Ce manuscrit se divise en 3 axes de recherche :

- 1- Dans le premier axe, nommé « **Microbiome de blé, origine et diversité** », nous exposerons la nature des espèces fongiques et bactériennes isolées à partir de plants de blé sains sur des milieux de culture non sélectifs, ainsi que les espèces de *Trichoderma*, colonisant la rhizosphère, isolées sur un milieu de culture sélectif. Ce chapitre met en lumière l'origine des quelques souches que nous avons étudiées exhaustivement dans la suite de nos travaux.
- 2- Dans le deuxième axe, nommé « **Trichoderma** », nous instruirons exhaustivement les potentiels PGP et BCA de six souches de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique (*in vitro* et *in vivo*) contre la fusariose des semences chez le blé, causée par *F. culmorum*. Ces souches ont été spécialement isolées dans le cadre de l'axe 1.

- 3- Dans le troisième axe, nommé « **Rhizobacteria** », nous dépeindrons la diversité du caractère *Plant Growth Promoting* de plusieurs bactéries sur une variété de blé dur moderne (Karim), et de leurs effets antagonistes directs contre *Fusarium culmorum* en milieu axénique. De même, seront exposées des données d'expression transcriptionnelles de quelques gènes de défenses végétales potentiellement modulées par ces bactéries.

Le premier axe correspond ici à un prérequis exploratoire dans mes activités de recherche globale à partir duquel, ultimement, découlent les deux derniers axes de recherche qui ciblent la mise en évidence des aptitudes bénéfiques de certains champignons et bactéries ainsi isolés. Ces micro-organismes d'intérêt auraient pour valorisation potentielle d'être incorporés ensemble à des communautés synthétiques potentialisatrices de production végétale, voire seraient la base de formulation nouvelles.

Les principaux résultats des deux derniers axes de recherche se sont concrétisés par la rédaction de deux articles dont le premier a été accepté dans le journal *Microorganisms*<sup>®</sup>, et le second article a été soumis dans le journal *PLoS One*<sup>®</sup>.

En fin de mémoire, l'ensemble des résultats principaux générés au travers de ces trois axes de recherche sera discuté, et nous partagerons quelques perspectives potentielles.



## ***Axe de recherche 1***

**Microbiome de blé,  
Origine et diversité**

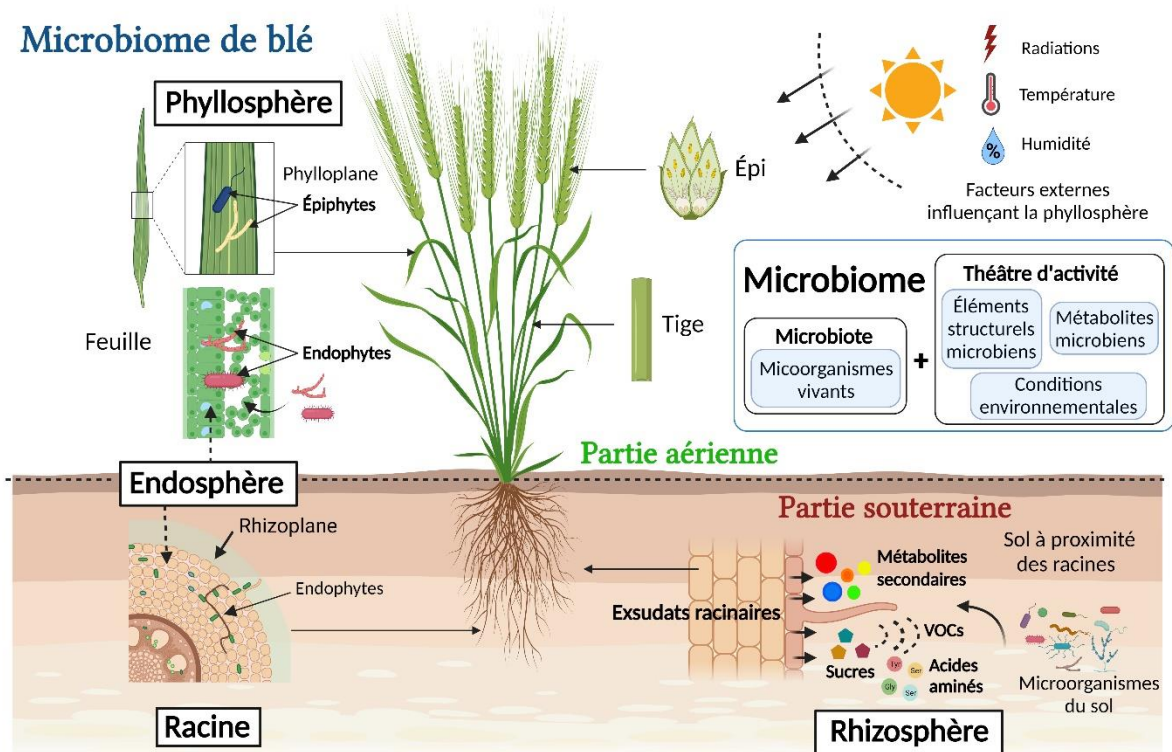
## I. Introduction

Les micro-organismes sont essentiels pour le maintien de la vie sur terre, mais on en sait peu sur la majorité de ces organismes qui colonisent l'environnement tels que les sols, les océans, l'atmosphère et même notre corps (Gilbert et al., 2010). Au cours des deux dernières décennies, l'amélioration de nos connaissances sur les communautés microbiennes ou microbiomes est devenue un sujet majeur non seulement pour la communauté scientifique mais aussi pour le grand public. En effet, ces microbiomes seraient une alternative prometteuse pour remplacer les produits chimiques toxiques en agriculture, horticulture et aquaculture et assurer ainsi une utilisation durable des ressources naturelles (Busby et al., 2017 ; Singh et al., 2017). Le microbiome a été défini comme l'ensemble des micro-organismes vivant ensemble ou microbiotes, plus précisément l'assemblage multi-espèces des communautés microbiennes dans lesquelles les micro-organismes interagissent les uns avec les autres dans un environnement contigu ayant des propriétés physico-chimiques distinctes comme leur propre théâtre d'activité (Berg et al., 2018 ; Konopka, 2009). Le microbiome englobe aussi l'ensemble des molécules produites par les micro-organismes impliqués dont les structures microbiennes (ADN, protéines, lipides et polysaccharides), les éléments génétiques mobiles (les phages, les virus et les transposons), les métabolites (molécules de signalisation, toxines, molécules organiques et inorganiques), relic DNA (ADN extracellulaire dérivé de cellules mortes) et les molécules produites par les hôtes, coévoluant ensemble dans les conditions environnementales de l'habitat pour former une niche écologique spécifique (Marchesi et Ravel, 2015). Les virus, les plasmides, les phages, les viroïdes, les prions et l'ADN libre font partie du microbiome mais, comme ils ne sont pas considérés comme des micro-organismes vivants, ils n'appartiennent pas au microbiote (Dupré et al., 2009).

Le microbiome végétal ou phytomicrobiome est composé d'une grande diversité de micro-organismes qui colonisent tous les tissus végétaux accessibles. Cette diversité comprend des « biontes », c'est à dire des communautés de bactéries, de champignons, de protistes et de nématodes qui forment avec leur hôte une unité écologique discrète appelée « holobionte » (Vandenkoornhuysen et al., 2015). Tout comme le microbiome humain est important pour la santé, le phytomicrobiome est essentiel pour les plantes, voire vital étant donné qu'elles ne peuvent pas se déplacer pour acquérir suffisamment de nutriments ou posséder l'ensemble des arsenaux chimiques et physiques nécessaires pour se défendre contre des agents pathogènes (Agler et al., 2016). Le phytomicrobiome, constitué par des micro-organismes bénéfiques, pathogènes et neutres, est indispensable au fonctionnement optimal de l'holobionte végétal, en influant directement sur le déroulé de différents processus physiologiques comme la germination et la croissance, l'apport de nutriments, la résistance aux facteurs de stress biotiques et abiotiques, et la production de métabolites bio-actifs (Berg et al., 2016). A cet égard, le phytomicrobiome est considéré comme élément clé pour la prochaine révolution verte, et un outil puissant pour assurer une production agricole durable dans un monde en évolution. Les produits agricoles à base de microbiotes sont l'un des secteurs agronomiques à forte croissance avec un Taux de Croissance Annuel Composé (TCAC)\* de 15 à 18%, et une valeur prévue de plus de 10 milliards dollars US d'ici 2025 (Dunham, 2017). En raison de cette grande importance, plusieurs stratégies de « *microbiome management* » ont été développées dont les greffes de microbiome comme



\* **Le taux de croissance annuel composé (TCAC)** est un indicateur financier de performance qui mesure la croissance moyenne d'une entreprise sur une période donnée. Il est utilisé pour évaluer la performance financière d'une entreprise et pour comparer sa croissance à celle d'autres entreprises, Le terme "composé" fait référence à l'utilisation des intérêts composés dans le calcul. Les intérêts composés signifient que les gains ou les intérêts générés au fil du temps sont ajoutés au montant initial, ce qui entraîne des gains sur les gains précédents. En d'autres termes, les intérêts sont réinvestis pour générer davantage d'intérêts.



**Figure 26. Composition du microbiome de blé** (Source personnelle, réalisée avec Biorender). Le microbiome de blé est divisé en deux parties colonisées par des endophytes et des épiphytes : une partie aérienne (phyllosphère) influencée par des facteurs externes (radiations, températures et humidité), et une partie souterraine (racines et rhizosphère) influencée par les exsudats racinaires. Le microbiote formé par les micro-organismes vivants et son théâtre d'activité (métabolites microbiens, conditions environnementales et éléments structurels microbiens) forment le microbiome.

le fumier, les inoculants et les extraits microbiens (Berg et al., 2009), pour atteindre de multiples objectifs vitaux comme : (i) réduire l'incidence des maladies, (ii) augmenter la production agricole, et (iii) réduire les intrants et les émissions des gaz à effet de serre (Bloemberg et al., 2001 ; Andrews, 1992 ; Bakker et al., 2012 ; Adesemoye et al., 2009 ; Singh et al., 2010).

Malgré la place stratégique qu'occupe le blé parmi les espèces d'intérêt agronomique, l'utilisation du phytomicrobiome dans les cultures de blé est encore très limitée. La plupart des recherches s'intéressent à étudier les micro-organismes rhizosphériques (Hartmann et al., 2014 ; Mahoney et al., 2017 ; Ofek et al., 2013 ; Yin et al., 2017). La rhizosphère est une région très riche en diversité microbienne qui vient en grande partie du sol et qui est sous l'influence des exsudats racinaires (Kent et al., 2002). La phyllosphère est relativement pauvre en nutriment et est sujette à des températures extrêmes, aux radiations et à des fluctuations en humidité très importantes (Vorholt et al., 2012). Les organismes vivants occupant la phyllosphère et la rhizosphère, et qui sont proches ou sur les tissus végétaux sont considérés comme des épiphytes, alors que ceux résidant dans les tissus végétaux (l'endosphère) sont qualifiés d'endophytes. Tous ces micro-organismes contribuent au phénotype étendu de leur hôte et peuvent être considérés comme une extension pour former un deuxième génome ou collectivement un pan-génome (Oldroyd et al., 2011).

Au cours des dernières décennies, l'agriculture intensive s'est fortement appuyée sur l'usage des intrants pour maximiser la production. Par exemple, l'application intensive de fertilisants azotés inorganiques réduit la richesse et la diversité bactérienne au sein du microbiome du blé (Kavamura et al., 2018 ; IPBES, 2019). Cette perte de diversité peut entraîner une altération de la composition des communautés microbiennes ou « dysbiose », ce qui a un impact dévastateur en cascades sur les performances immunes végétales, facilitant ainsi l'émergence de contaminations opportunistes d'agents pathogènes (Tamboli et al., 2004 ; Hooks et al., 2017 ; Bello et al., 2018). En plus de ce facteur anthropique, la domestication et la sélection variétale du blé ont engendré une divergence génétique et phénotypique des variétés modernes issues de leurs ancêtres. Ce processus a considérablement modifié le microbiome racinaire avec un impact négatif sur la capacité des variétés modernes à interagir avec les PGPR en comparaison avec les variétés locales et les cultivars de grande taille (Valente et al., 2019).

L'approche « *back to the roots* », proposée par Pérez-Jaramillo et ses collègues, consiste à explorer et identifier le microbiome des plantes indigènes et de leurs habitats d'origine dans l'objectif de rétablir les associations bénéfiques perdues lors de la domestication. Cette approche a été utilisée dans notre étude avec la variété ancienne de blé « *Florence Aurore* » cultivée en agriculture biologique. Nous ciblions ainsi les bactéries et les champignons endophytes qui représentent deux groupes majeurs du microbiome du blé (**Figure 26**). En effet, nous partons du postulat que leurs interactions influencent les fonctions physiologiques générales de la plante hôte, ainsi que la composition et le dynamisme des autres communautés déjà existantes. Le choix de cette communauté spécifique est justifié par l'importance des endophytes comme inoculants stimulateurs de la croissance, et aussi comme source de nouveaux métabolites secondaires actifs (Wargo et Hogan, 2006). L'adoption des méthodologies appropriées pour l'isolement (*eg* choix des milieux de culture) et la culture des souches cultivables préalablement à leur caractérisation phénotypique d'une part, ainsi que leur identification moléculaire par séquençage de certains loci à partir de leur ADNg d'autres part, permettent de mieux

étudier les espèces microbiennes isolées dans l'objectif de comprendre leur fonction écologique.

Dans ce premier chapitre, nous nous sommes intéressés : (i) à isoler les communautés bactérienne et fongique colonisant l'épi, les racines et le sol rhizosphérique de la variété ancienne de blé *Florence Aurore*, (ii) et à définir le rang taxonomique (genre et espèce) des bactéries et champignons isolés par le séquençage de leur région ADNr 16S et ITS, respectivement.

Nous précisons enfin que ces isolements sont un prérequis crucial afin de pouvoir isoler physiquement des souches. Bien que leur identification moléculaire soit très informative au regard de la bibliographie sur notre sujet, nous ciblerons certaines souches bactériennes et fongiques afin d'en apprécier leur potentiels PGP et BCA contre *F. culmorum* sur des variétés de blé modernes. En effet, une diversité phénotypique est généralement observée entre des espèces qui appartiennent à un même clade phylogénétique. La finalité est avant tout de pouvoir identifier spécifiquement des souches bénéfiques, potentiellement valorisables en culture biologiques. Ce sont ces caractérisations phénotypiques qui structureront les axes de recherche qui suivront ce présent axe.

Enfin, ce chapitre n'aboutirait pas à la rédaction d'un article. La structure générale de ce chapitre est alors présentée de manière « classique », incluant notamment un item *Matériels et Méthodes* dans lequel sont détaillés les moyens déployés pour réaliser les échantillonnages, les isolements et l'identification des souches. Certaines de ces méthodologies sont décrites dans les articles partagés dans les axes de recherche 2 et 3. Cependant, leur description dans ces axes répond à des objectifs précis d'isolement d'espèces de micro-organismes particuliers (bactéries et *Trichoderma* spp.), ce qui ne rend pas compte de l'intégralité du travail réalisé en amont et qui est partagé dans ce présent chapitre, notamment sur la diversité des micro-organismes isolés au final.

## **II. Matériels et Méthodes**

### **II.1. Site d'échantillonnage**

Le site d'étude est situé dans la région 'Gosset el bey' située sur la route C55 de la ville de Mateur (gouvernorat de Bizerte), à 60 kilomètres environ au nord-ouest de Tunis. Cette région est située à 36.924096° de latitude et 9,699089° de longitude, et à 133 m d'altitude. La région est caractérisée par un climat méditerranéen "tempéré chaud" ou "subtropical". Les précipitations sont plus importantes en hiver qu'en été, et sont en moyenne de 539 mm par an. La carte climatique de Köppen-Geiger classe le climat de cette région comme étant de type Csa (à été chaud). Cette région affiche une température annuelle moyenne de 18°C.

## **II.2. Matériel végétal**

La variété de blé « *Florence Aurore* » cultivée dans un système d'agriculture biologique a fait l'objet de cette étude. Il s'agit d'une variété ancienne de blé non barbu ou "nu" qui a été créée en 1936, et enregistrée par l'INRAE en 1963. Elle peut être semée à l'automne ou au printemps, ce blé est considéré comme un blé de force (15 % de protéines).

Des plantules saines et entières (avec le sol rhizosphérique) au stade épiaison ont été prises au hasard dans la parcelle. Les échantillons ont été placés individuellement dans des sachets plastiques stériles renfermant des étiquettes portant les coordonnées des prélèvements et ramenées au laboratoire pour l'isolement des micro-organismes colonisant les différents tissus. L'approche utilisée est l'isolement direct, elle consiste à étaler les échantillons sur des milieux de culture solides de manière à obtenir des colonies isolées.

## **II.3. Isolement des micro-organismes sur milieux de culture non sélectifs**

### **II.3.1. Prétraitement des échantillons**

Les échantillons ont été disséqués afin d'en singulariser les épis et racines. Les organes ont été lavés à l'eau du robinet, et coupés en petits morceaux de quelques millimètres à l'aide d'un scalpel stérile.

### **II.3.2. Choix des milieux de culture**

Deux milieux de culture ont été utilisés pour ce premier isolement non sélectif :

- Le milieu « *Tryptic Soy Agar* » (TSA, Fisher Scientific) un milieu polyvalent et non sélectif qui fournit suffisamment de nutriments pour permettre la croissance d'une grande variété de bactéries
- Le milieu « *Potato Dextrose Agar* » (PDA, Fisher Scientific) un milieu de culture à base d'infusion de pomme de terre et de dextrose, favorisant la croissance d'un large éventail de champignons

### **II.3.3. Isolement des endophytes colonisant l'épi**

Les morceaux d'organes ont subi deux séries de désinfection superficielle à l'éthanol 70% pendant 1 min, d'hypochlorite de sodium NaOCl 0,5% (v/v) pendant 1,5 à 2 min, suivi de deux rinçages à l'eau distillée stérile. Les morceaux désinfectés ont été placés en boîtes de Pétri sur milieux de culture, à raison de 5 morceaux par boîtes. Ces boîtes ont été ensuite incubées à l'obscurité à  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$  pendant 9 jours, et vérifiées tous les 2 ou 3 jours jusqu'au neuvième jour pour vérifier l'apparition des micro-organismes (Larran et al., 2002).

Les colonies sortant des segments sur milieux de culture ont été transférées sur milieu de culture PDA (pour les champignons) ou sur milieu Luria-Bertani (Bertani, 1951) (ou LB, pour les bactéries) afin d'avoir une culture pure par repiquage successif.

### **II.3.4. Isolement des endophytes colonisant les racines**

Les segments racinaires lavés ont subi trois séries de désinfections superficielles : à l'éthanol 70% pendant 1 min, à l'hypochlorite de sodium (2%, v/v) pendant 3 min et enfin à l'éthanol 70% pendant 30 s suivi de deux rinçages à l'eau distillée stérile. Les segments racinaires désinfectés ont été broyés à l'aide d'un mortier et un pilon dans 2 ml de tampon PBS 0,05 M (NaCl, 140 mM ; KCl, 2,5 mM ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 mM, pH 7,4), ou dans une solution de  $\text{MgSO}_4$  (0,1 M). La suspension fut filtrée, puis un volume de 500  $\mu\text{l}$  a

été étalé sur les milieux de culture (Hameed et al., 2004). Une seconde méthode a été utilisée : les racines désinfectées ont été coupées longitudinalement, puis placées en petits morceaux de 5mm sur les milieux de culture. Les colonies qui apparaissent lors de l'incubation ont été transférées et purifiées selon les mêmes procédures décrites précédemment.

### **II.3.5. Vérification de l'efficacité de la méthode d'isolement**

Il est possible de confirmer que les micro-organismes isolés sont des endophytes uniquement si la stérilisation en surface des racines et de l'épi est complète. La validation de la désinfection a été vérifiée en appliquant le matériel utilisé lors du dernier rinçage sur milieu de culture Malt-Agar. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C, et vérifiées quotidiennement pour confirmer l'absence de possibles épiphytes échappant à la méthode de stérilisation.

### **II.3.6. Isolement de la communauté colonisant le sol rhizosphérique**

L'isolement des micro-organismes de la rhizosphère a été réalisé selon la méthode de suspension-dilution (Somasegaran et Hoben, 1994). Des dilutions décimales de 10ml ont été réalisées en tubes à essai à partir d'une solution mère contenant 1 g de sol adhérant étroitement aux racines et 9ml d'eau distillé stérile. Après agitation et homogénéisation, 500µl de chaque dilution a été déposé sur milieux de culture. Les préparations ont été incubées à 28°C, jusqu'à l'apparition de colonies.

### **II.4. Isolement des *Trichoderma* de la rhizosphère sur milieu de culture sélectif**

L'isolement des *Trichoderma* a été réalisé à partir de 1g de sol adhérant étroitement aux racines selon la méthode déjà décrite. Des dilutions sérielles ont été préparées puis étalées sur le milieu « *Trichoderma selective media* » (TSM) développé par Elad et al. (1981). Le milieu sélectif TSM est couramment utilisé pour l'isolement quantitatif de nouvelles souches de *Trichoderma* spp. d'un substrat quelconque, tel un sol par exemple, car sa faible teneur en glucose permet une croissance et une sporulation rapide du champignon, et il contient notamment plusieurs antibiotiques : le chloramphénicol pour inhiber la croissance bactérienne, et le pentachloronitrobenzène, le sulfonate de sodium *p*-diméthylaminobenzènediazo et le rose bengale qui sont trois inhibiteurs fongiques sélectifs (*Fisher Scientific S.A.S*).

Après cinq jours d'incubation à 28°C, toutes les souches fongiques qui émergeaient ont été récupérées individuellement puis cultivées de nouveau sur le milieu PDA pour générer des cultures pures.

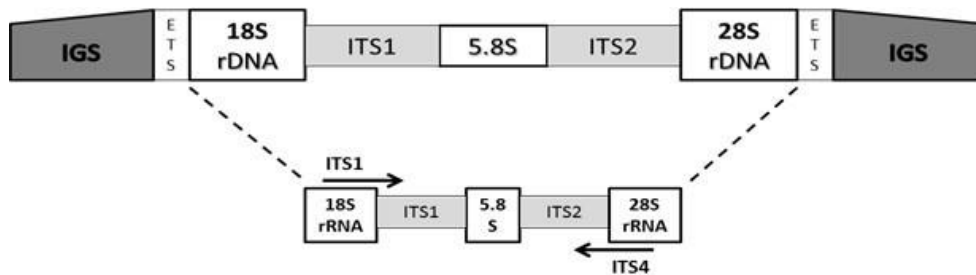
### **II.5. Conservation des souches**

La conservation des souches a été assurée à partir de colonies pures de bactéries et de mycélium fongique, préalablement mélangées avec du glycérol 20% dans des flacons cryogéniques, l'ensemble placé à -20°C.

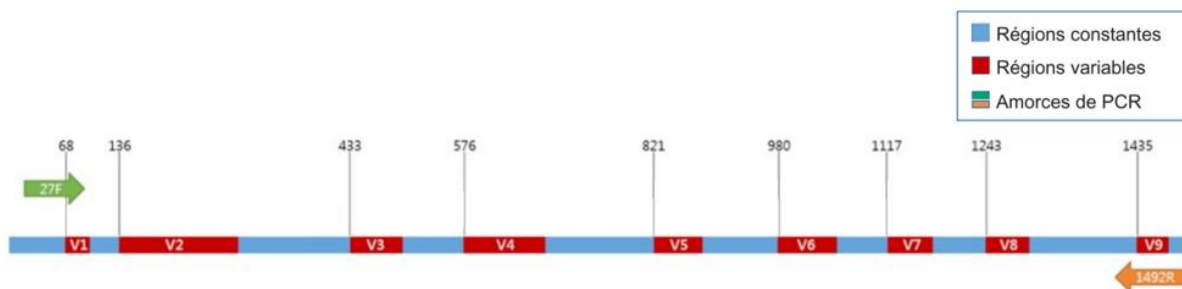
### **II.6. Identification moléculaire des isolats**

#### **II.6.1. Extraction des ADNg**

Pour les isolats fongiques, l'ADN génomique a été extrait à partir de mycélium frais en utilisant la méthode CTAB développée par Doyle et Doyle (1987). Le mycélium de chaque



**Figure 27. Représentation schématique de l'ARNr avec l'emplacement des amorces ITS1 et ITS4** (Mazari et al., 2017). L'opéron du gène codant l'ARNr comprend trois gènes principaux (l'ARNr 5.8S, 18S et 25S ou 28S), et des régions « entre-espaces » entremêlés (IGS : intergenic spacer ; ETS : external transcribed spacer ; ITS : internal transcribed spacer).



**Figure 28. Représentation schématique de l'ARNr 16S** (Falentin et al., 2019). Illustration des régions constantes (en bleu) et des régions variables (en rouge) du gène codant l'ARNr 16S, et emplacement du couple d'amorces utilisé pour l'amplification de ces régions (en vert et orangé).

souche fongique a été gardé dans un tube eppendorf dans de l'azote liquide avant le broyage et les blocs portant les tubes ont été placés pendant 2h au minimum à -80°C pour assurer un broyage au frais. Les mycéliums ont été broyés par agitation vigoureuse avec des billes métalliques dans 250µl de tampon CTAB.

La méthode Phénol-Chloroforme a été utilisée pour les souches bactériennes. L'ADN génomique a été extrait à partir de culture en phase logarithmique tardive ou en phase stationnaire précoce (Wilson et al., 1990).

### II.6.2. PCR et Séquençage

Deux régions ont été ciblées pour l'amplification PCR des matrices :

- Pour les champignons, la région ITS (**Figure 27**) a été amplifiée en utilisant le couple d'amorces ITS1/ITS4. Les séquences nucléotidiques sont : ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990). Ces amorces permettent l'amplification d'une région relativement variable qui comporte les espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 et la petite sous unité ribosomale 5,8S peu variable. Cette région d'environ 500 nucléotides présente des polymorphismes très informatifs qui permettent de discriminer les espèces fongiques.
- Quant aux bactéries, le gène codant l'ARNr 16S (**Figure 28**) a été amplifié en utilisant le couple d'amorces 27F et 1492R. Leurs séquences nucléotidiques sont : 27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Wilson et al., 1990). Ce gène est présent chez toutes les bactéries. La séquence nucléotidique présente une alternance de régions hypervariables (de V1-V9) et de régions constantes utilisées pour identifier des espèces.

Les amplifications PCR ont été réalisées par un thermocycleur BioRad. Le programme consistait en une dénaturation initiale à 95°C de 2min, suivie de 35 cycles de dénaturation de 30s à 95°C, d'hybridation des amorces à 58°C pendant 30 s, terminée par une extension d'amplification à 72°C pendant 45 s. Une extension finale à 72 °C pendant 5 min a été réalisée.

La réaction PCR a été assurée dans un volume total de 50µl, contenant 25µg d'ADN génomique, 10µl de tampon GoTaq Flexi incolore (5x), 3µL de solution MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µL de PCR Nucléotide Mix (10mM de chaque dNTP), 1µL de chaque amorce (5 mM), 0,25µL de GoTaq (G2 Flexi DNA Polymerase, 5u/µL), et le volume final ajusté avec de l'eau stérile.

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) et visualisés avec du SYBR Green. Les amplicons ont été séquencés par la société privée Genewiz, une société de service en génomique basée en Allemagne. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été analysées par un alignement Blast sans *a priori* sur le site NCBI (ce qui correspond à l'identification taxonomique éventuelle de chaque micro-organisme isolé), puis enregistrées sur ce même site pour l'obtention de numéros d'accessions.

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Microbiotes bactérien et fongique cultivables dans la rhizosphère et l'endosphère du blé

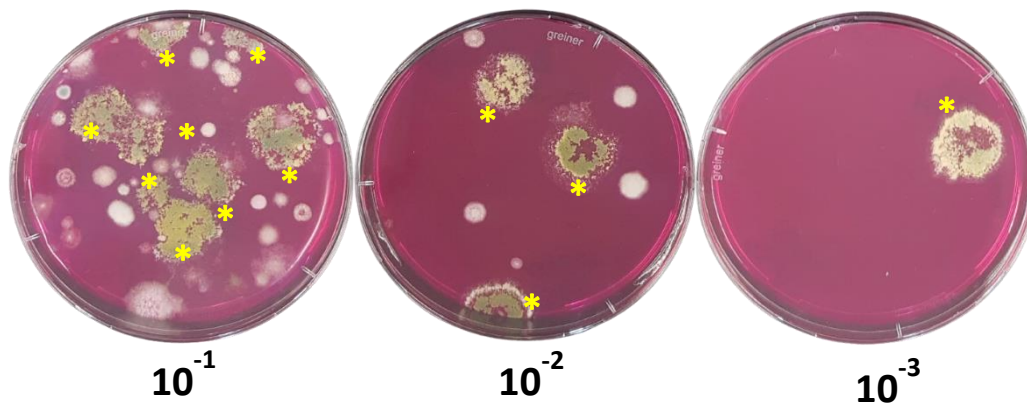
Le microbiome du blé abrite diverses communautés microbiennes très riches qui, ensemble, jouent un rôle crucial dans le maintien de la santé du blé et dans sa protection contre les stress d'origine biotique et abiotique. De nombreuses études ont montré que le microbiome du blé comprend principalement des champignons, des bactéries, des virus, des actinomycètes, des cyanobactéries, des protozoaires, des archées, etc., qui offrent de nombreux avantages tels que la lutte contre les agents pathogènes, l'amélioration de la résistance au stress et la promotion de la croissance des plantes dans des conditions défavorables (Mahapatra et al., 2020). Il existe plusieurs raisons d'isoler ces micro-organismes associés aux plantes, notamment pour leur caractérisation et l'étude de la dynamique et la diversité des populations, avec pour objectif majeur de les utiliser comme inoculant pour améliorer la croissance et la santé des plantes et comme source de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs (Schulz et al., 2002 ; Strobel, 2003 ; Schulz et Boyle, 2005).

L'objectif principal de cette étude est d'isoler et d'identifier de nouveaux candidats potentiels pour la promotion de la croissance et la lutte contre *Fusarium culmorum* chez le blé plutôt que de fournir une vue complète du microbiote existant. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur une approche culturale pour comparer les communautés bactériennes et fongiques existantes.

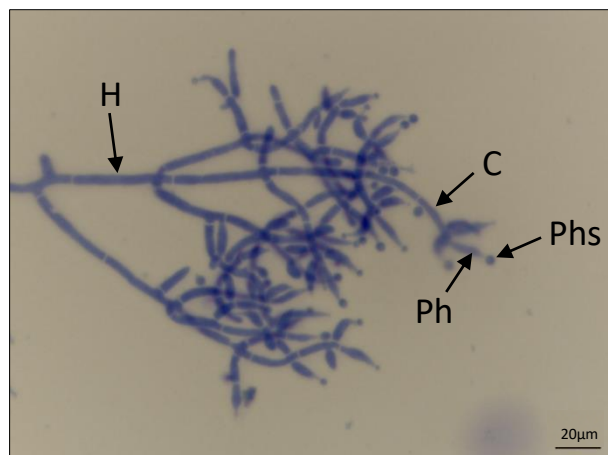
La procédure d'isolement du microbiote colonisant la rhizosphère et l'endosphère est une étape critique et importante. Elle est dépendante du choix de l'approche méthodologique d'isolement employée. D'un point de vue pratique, l'efficacité de la méthode d'isolement reste toujours relative car les micro-organismes peuvent se fixer sur les cellules/surfaces végétales, ou s'introduire dans des niches intercellulaires et être inaccessible à la méthode d'isolement. De plus, il n'existe pas une délimitation nette entre l'extérieur et l'environnement interne de la plante, et certaines bactéries se déplacent constamment entre ces deux micro-habitats ainsi que certains champignons peuvent développer leur mycélium de la surface vers l'intérieur des racines (Hallmann et al., 2006).

Pour l'endosphère, nous avons ciblé les endophytes colonisant les racines et l'épi après une stérilisation de leur surface. Cette approche méthodologique a été secondée d'une étape de vérification durant laquelle nous nous sommes assurés que les épiphytes aient été éliminés, et ainsi confirmer que les souches isolées correspondaient à des endophytes. Les procédures d'isolement les plus couramment utilisées combinent la stérilisation de surface des tissus avec soit une macération du tissu végétal et stries sur gélose nutritive, soit un étalement de petits segments stérilisés sur de la gélose nutritive. Il existe également d'autres méthodes qui évitent la stérilisation de surface comme l'extraction sous pression (Hallmann et al., 2006).





**Figure 29. Croissance de *Trichoderma* sur milieu sélectif TSM à partir d'une dilution sériée.** Les étoiles jaunes indiquent les emplacements putatifs de *Trichoderma* par rapport aux autres espèces fongiques.



**Figure 30. Aspect microscopique du genre *Trichoderma* sous microscope optique (x400).** H : Hyphe, C : Conidiophore, Ph : Phialide et Phs : Phialospore.

Le choix du milieu de culture est crucial car il conditionne le type de micro-organismes isolés. Ainsi, les milieux non sélectifs TSA et PDA ont été utilisés, favorisant la croissance d'une large gamme d'espèces de bactéries et de champignons (Gardner et al., 1982 ; Philipseon et Blair, 1957).

Pour la rhizosphère, nous avons utilisé la méthode de suspension-dilution quel que soit le milieu de culture employé (Somasegaran et Hoben, 1994). L'approche utilisée s'est montrée efficace pour obtenir le microbiote ciblé. Toutes les plantes échantillonnées abritaient des champignons et des bactéries dans leurs tissus internes ainsi que dans la rhizosphère, générant ainsi des totaux de 44 isolats fongiques et 102 isolats bactériens.

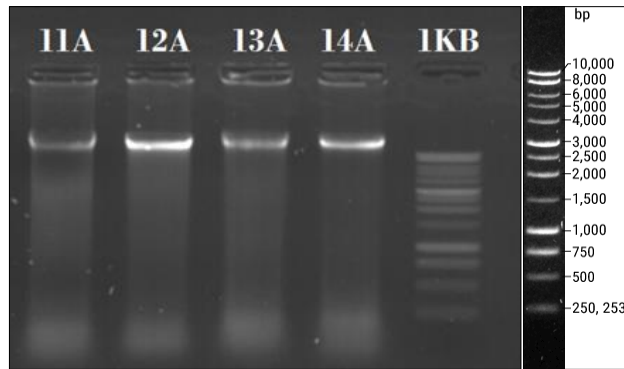
Pour l'isolement spécifique des *Trichoderma*, le milieu TSM a été très efficace, avec un total de 111 isolats contre 3 isolats sur le milieu PDA qui ne viennent pas de la rhizosphère mais des racines. Ce milieu TSM contient des agents sélectifs qui permettent d'inhiber la croissance bactérienne ainsi que de limiter la taille et la hauteur des colonies fongiques à croissance rapides (Elad et al., 1981).

La présence des souches de *Trichoderma* a été observée dans tous les échantillons de sol rhizosphérique et avec toutes les dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ). L'apparence macroscopique des souches était classique. Elle correspondait à des colonies grisâtres à verdâtres, dont les croissances étaient très rapides et envahissantes, et présentant un aspect très sporulant. Après repiquage sur milieu PDA, la germination d'une conidie donne naissance à un mycélium concentrique et blanchâtre. Lors de l'expansion de la colonie mycélienne, une couleur verdâtre apparaît rapidement sur les parties aériennes du mycélium. La morphologie des colonies mycéliennes et leur évolution rapide dans le temps (aspect, couleur) sont communes au genre *Trichoderma* (**Figure 29**).

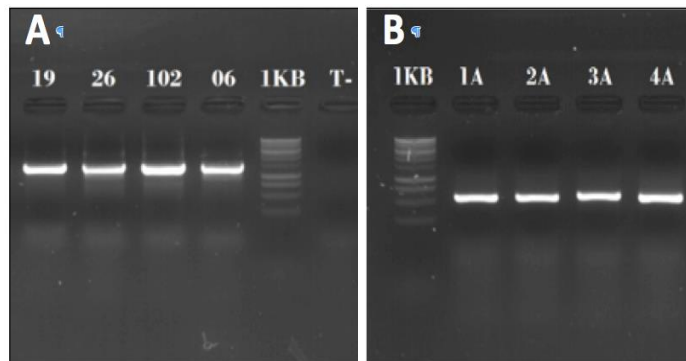
Cette identification macroscopique a été secondée par une observation au microscope optique (**Figure 30**). Nous avons ainsi identifié des mycélia composés d'hyphes ramifiés aux parois lisses, et des conidiophores très ramifiés portant des phialides en forme de flasque typique. A leur tour, les phialides portent des spores sphériques. L'ensemble de ces structures cellulaires et leur morphologie générale (hyphes, conidiophores, phialides, phialospores et conidiospores) sont caractéristiques du genre *Trichoderma*, et permettent d'être affirmatif quant à leur identification (Gams et Bissett, 2002).

Certaines espèces de *Trichoderma* ont été signalées comme des champignons associés au blé. A cet égard, *T. harzianum* développe une activité antagoniste contre des champignons phytopathogènes de blé comme *Bipolaris sorokiniana* (Rodriguez et al., 2022), et d'autres espèces comme *T. afroharzianum* et *T. guizhouense* se sont avérés être des endophytes racinaires améliorant le développement des semis et le rendement (Matar et al., 2022).

En plus des souches de *Trichoderma* isolées sur le milieu TSM, 51 autres souches fongiques ayant un aspect différent se sont développées. Ces souches furent également isolées, puis identifiées par séquençage pour avoir le plus d'informations sur la nature de la communauté fongique qui colonise la même niche rhizosphérique que *Trichoderma*.



**Figure 31. Profils de l'ADN génomique de quelques isolats fongiques sur gel d'agarose (1%).** Profil de migration montrant une seule bande pour chaque puit et qui correspond à l'ADN génomiques extrait à partir de mycélium des champignons isolés.



**Figure 32. Profils des produits d'amplification sur gel d'agarose (1,5%).** (A) Amplicons de l'ADNr 16S ( $\approx 1500$ pb) de quelques isolats bactériens (puits en chiffre) ; (B) amplicons de la région ITS ( $\approx 500$ pb) de quelques isolats fongiques (puits en chiffre/lettre). 1KB : marqueur de taille ; T- : témoin négatif d'amplification PCR.

### III.2. Identification moléculaire et phylogénie du microbiote isolé

L'extraction des ADNg bactérien a été réalisée de manière classique. Elle débute par une lyse des parois suivie de purifications successives afin d'éliminer les sucres, protéines et ARN. Cette extraction organique a été la méthode la plus utilisée pendant de nombreuses années. Il s'avère qu'elle est l'une des plus fiable et efficace méthode d'extraction d'ADNg, cependant, elle prend du temps, utilise des produits chimiques nocifs, et en raison de l'effort pratique et des transferts de solution de tube en tube entre chaque étape d'extraction, il y a toujours un risque de contamination et de mauvaise manipulation des échantillons (McKiernan et Danielson, 2017).

Quant à l'extraction des ADNg de tous les isolats fongiques, deux méthodes ont été employées : la première consiste en un broyage des hyphes dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et pilon, et la seconde par agitation vigoureuse des hyphes en contact de billes métalliques et l'ensemble plongé dans du tampon CTAB. La seconde méthode de broyage s'est révélée certes plus rapide mais surtout plus efficace que la première méthode. Elle sera adoptée pour toutes les extractions d'ADNg ainsi que celles des ARN<sub>totaux</sub> utilisés dans les axes de recherche 2 et 3.

En comparaison avec d'autres méthodes d'extraction d'ADNg de champignons cultivés *in vitro* sur milieu de culture solide, la méthode d'extraction avec le tampon CTAB est moins onéreuse, plus efficace et applicable à un large éventail d'applications, notamment le *DNA barcoding*, le *shotgun sequencing* et le séquençage à lecture longue (*long-read sequencing*). Cependant, ce protocole utilise des solvants organiques nocifs pour l'expérimentateur, ce qui peut être un frein à son utilisation (Conlon et al., 2022).

Une analyse électrophorétique des produits d'extraction bactériens et fongiques sur gel d'agarose à 1%, a permis d'observer un seul fragment, dont la taille correspond à la taille de l'ADNg de chaque isolat (**Figure 31**).

Les extraits d'ADNg ont été utilisés pour amplifier le gène codant l'ADNr 16S chez les bactéries avec le couple d'amorces 27F/1492R, et la région ITS chez les mycètes avec le couple d'amorces ITS1/ITS4. La séquence de l'ADNr 16S est le marqueur génétique le plus utilisé en phylogénie et taxonomie bactérienne pour des raisons multiples : ce gène est présent chez la quasi totalité des espèces bactériennes. Son rôle fonctionnel est resté constant au fil du temps et sa longueur qui couvre environ 1500pb offre un ensemble de données suffisamment volumineux pour les analyses bioinformatiques (Patel, 2001). Pour la région ITS, elle est formée de deux régions variables ITS1 et ITS2, et du gène ribosomique intercalaire 5.8S hautement conservé. C'est le marqueur génétique le plus séquencé en mycologie. La longueur moyenne de la région ITS est de 550pb mais elle varie considérablement selon les lignées (Nilsson et al., 2015).

Les résultats ont montré une amplification pour tous les isolats et l'analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) a montré l'amplification d'un seul fragment d'ADN ayant une taille attendue d'environ 1500pb pour les bactéries et d'environ 500pb pour les champignons (**Figure 32A et B**).

Séquence ID	N° d'accension	NCBI best hit	Identité (%)	ADNr16S (pb)	Nombre d'isolat	Origine	Milieu d'isolement	Embranchement
B1	OP595769	<i>Achromobacter sp. MYb9</i>	99.64%	1425	3	Epi/Racine	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B2	-	<i>Agrococcus jenensis strain OAct930</i>	100%	1463	1	Rhizosphère	TSA	<i>Actinobacteria</i>
B3	OP595770	<i>Arthrobacter sp. SAP841.3</i>	99.49%	1447	3	Rhizosphère	TSA	<i>Actinobacteria</i>
B4	OP595771	<i>Bacillus halotolerans strain PL-3</i>	99.57%	1467	13	Epi/Racine/Rhizosphère	TSA/PDA	<i>Bacillota</i>
B5	OP595772	<i>Bacillus amyloliquefaciens strain JFP2</i>	99.86%	1464	3	Epi	PDA	<i>Bacillota</i>
B6	OP595773	<i>Bacillus simplex strain X10</i>	99.44%	1469	4	Epi/Racine/Rhizosphère	TSA	<i>Bacillota</i>
B7	OP595774	<i>Bacillus megaterium strain 16-Y9</i>	100%	1466	20	Epi/Racine/Rhizosphère	TSA/PDA	<i>Bacillota</i>
B8	OP595775	<i>Bacillus cereus strain HY-25</i>	99.72%	1460	2	Racine	TSA	<i>Bacillota</i>
B9	OP595776	<i>Bacillus pumilus strain HN-10</i>	99.59%	1452	1	Epi	PDA	<i>Bacillota</i>
B10	OP595777	<i>Bacillus subtilis strain isolate S8KB2</i>	94.71%	1425	1	Racine	PDA	<i>Bacillota</i>
B11	OP595778	<i>Bacillus mojavensis strain A21</i>	99.79%	1467	1	Epi	TSA	<i>Bacillota</i>
B12	OP595779	<i>Bacillus toyonensis strain LU4</i>	99.03%	1471	1	Racine	TSA	<i>Bacillota</i>
B13	OP595780	<i>Curtobacterium flaccumfaciens strain cqsV11</i>	100%	1378	3	Epi/Racine	TSA/PDA	<i>Actinobacteria</i>
B14	OP595781	<i>Delftia lacustris strain RK7</i>	97.94%	1452	2	Rhizosphère	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B15	OP595782	<i>Delftia acidovorans strain IAE185</i>	91.80%	1455	1	Rhizosphère	PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B16	OP595783	<i>Enterobacter hormaechei strain L51</i>	99.49%	1392	2	Racine	PDA/TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B17	OP595784	<i>Enterobacter ludwigii strain FDAARGOS</i>	99.64%	1382	2	Racine	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B18	OP595785	<i>Erwinia aphidicola strain Art_L7</i>	99.79%	1425	5	Epi	PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B19	OP595786	<i>Lysobacter terricola strain 5GH18-14</i>	99.21%	1425	1	Sol	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B20	OP595787	<i>Massilia albidiflava strain A3-7</i>	99.50%	1422	2	Sol	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B21	OP595788	<i>Paenibacillus peoriae strain D71_SO3R</i>	99.78%	1389	2	Racine	PDA	<i>Bacillota</i>
B22	OP595789	<i>Paenibacillus polymyxa strain R191</i>	99.01%	1441	1	Racine	PDA	<i>Bacillota</i>
B23	-	<i>P. agglomerans strain LA131</i>	89.35%	1222	1	Epi	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B24	-	<i>P. agglomerans strain LA131</i>	85.35%	1194	1	Racine	PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B25	OP595790	<i>Pantoea agglomerans strain Abp2</i>	94.05%	1225	1	Epi	PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B26	OP595791	<i>Pantoea agglomerans strain CCMM_B1251</i>	93.83%	1226	1	Epi	PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B27	OP595792	<i>Pseudomonas viridiflava strain F2</i>	98.45%	1455	1	Epi	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B28	OP595793	<i>Pseudomonas aeruginosa strain HL2</i>	100%	1350	5	Racine/Rhizosphère	TSA/PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B29	OP595794	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99.65%	1450	2	Racine	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B30	OP595795	<i>Pseudomonas putida strain JYR-1</i>	97.37%	1259	3	Epi	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B31	OP595796	<i>Rhizobium nepotum strain LcA22</i>	92.30%	1295	1	Racine	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B32	OP595797	<i>Serratia marcescens strain 11-SYU</i>	99.57%	1420	7	Epi	TSA/PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B33	OP595798	<i>Streptomyces colombiensis strain SZN155</i>	98.93%	1446	1	Rhizosphère	TSA	<i>Actinobacteria</i>
B34	OP595799	<i>Ralstonia pickettii strain Bcul-1</i>	86.67%	1418	1	Epi	PDA	<i>Pseudomonadota</i>
B35	OP595800	<i>Rosenbergiella epipactidis strain JR114</i>	99.45%	1460	1	Epi	TSA	<i>Pseudomonadota</i>
B36	OP595801	<i>Variovorax paradoxus strain JZY4-58</i>	99.07%	1399	2	Racine/Rhizosphère	TSA	<i>Pseudomonadota</i>

**Tableau 5. Caractéristiques moléculaires des souches bactériennes isolées.** Ces caractéristiques incluent la séquence ID, le numéro d'accension, le pourcentage d'homologie avec la souche la plus proche sur NCBI et la longueur de l'ADNr 16S.

Le séquençage des amplicons a été réalisé dans un seul sens pour les champignons (ITS≈ 500pb), et dans les deux sens pour les bactéries (ADNr 16S≈1500pb) du fait de leur longueur conséquente. Un alignement BLAST des séquences obtenues a été réalisé sur la banque de données NCBI pour déterminer l'affiliation taxonomique de toutes les souches isolées, et apprécier le pourcentage de similarité avec les souches proposées par NCBI.

Au total, 36 espèces bactériennes pour les 102 isolats et 34 espèces fongiques pour les 44 isolats, issus de l'isolement non sélectif, ont été identifiées (**Tableaux 5 et 6**).

Pour les bactéries, le pourcentage de similarité avec les souches les plus proches sur NCBI a varié entre 85 et 100%. Il est intéressant de souligner que les similarités dont les taux sont inférieurs à 97% pourraient représenter de nouvelles espèces, tel est le cas des souches B10, B15, B23, B24, B25, B26, B31 et B34 (Petti, 2007).

L'espèce *Bacillus megaterium* a été l'espèce la plus isolée, sa forte présence a été rapportée comme un indicateur caractéristique des racines (Comby et al., 2016).

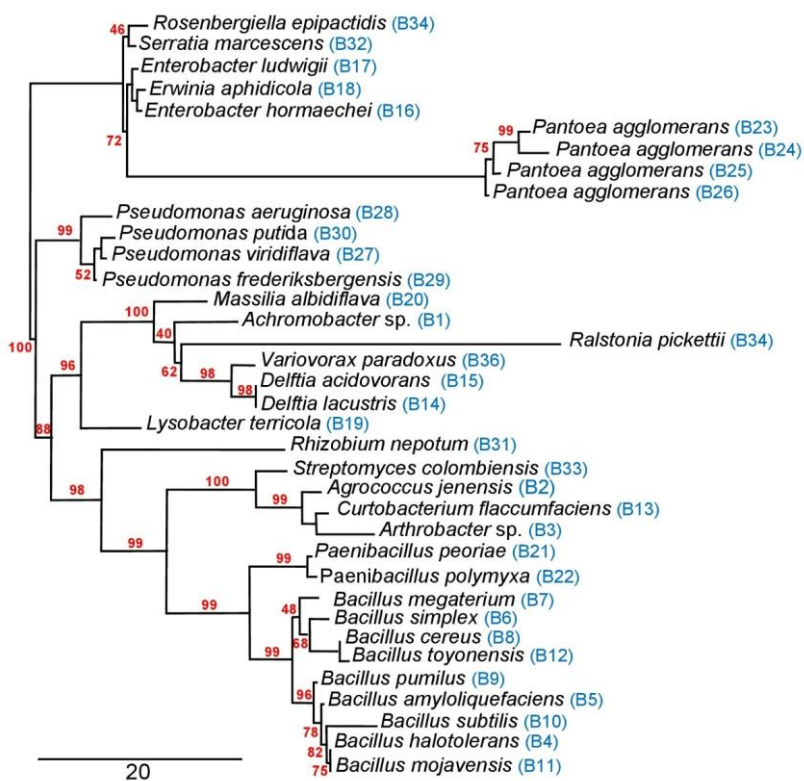
Pour les milieux d'isolement, 25 espèces ont été isolées sur le milieu TSA, 17 espèces sur le milieu PDA et 6 espèces ont été isolées sur les deux milieux. L'arbre phylogénétique basé sur le séquençage de l'ADNr 16S a montré que les espèces identifiées appartiennent à 3 embranchement : *Pseudomonadota* qui était l'embranchement le plus représenté avec 21 espèces, *Bacillota* représenté par 11 espèces mais par le plus grand nombre d'isolats (46 isolats), et *Actinobacteria* qui était l'embranchement le moins représenté avec uniquement 4 espèces. Le genre *Bacillus* était le plus dominant avec 9 espèces différentes parmi les 19 genres trouvés (**Figure 33**).

En ce qui concerne les champignons, le taux d'homologie trouvé sur NCBI a varié entre 90 et 100%, la faible similitude observée chez certaines souches doit être confirmée par d'autres marqueurs moléculaires comme les gènes codant le *translation elongation factor 1-α* (*tef1α*) et la *RNA polymerase II subunit B* (*RPB2*). De même, la caractérisation de caractères morphologiques pour affirmer qu'il s'agit de nouvelles espèces devra être entreprise (Tomah et al., 2020). Au contraire des bactéries, le milieu PDA a permis d'isoler 22 espèces fongiques contre 12 seulement sur le milieu TSA. Ainsi, l'espèce *Alternaria infectoria* a été isolée sur les deux milieux. Cette espèce présente au niveau de l'épi a été considérée comme espèce indicateur caractéristique des parties aériennes (Comby et al., 2016).

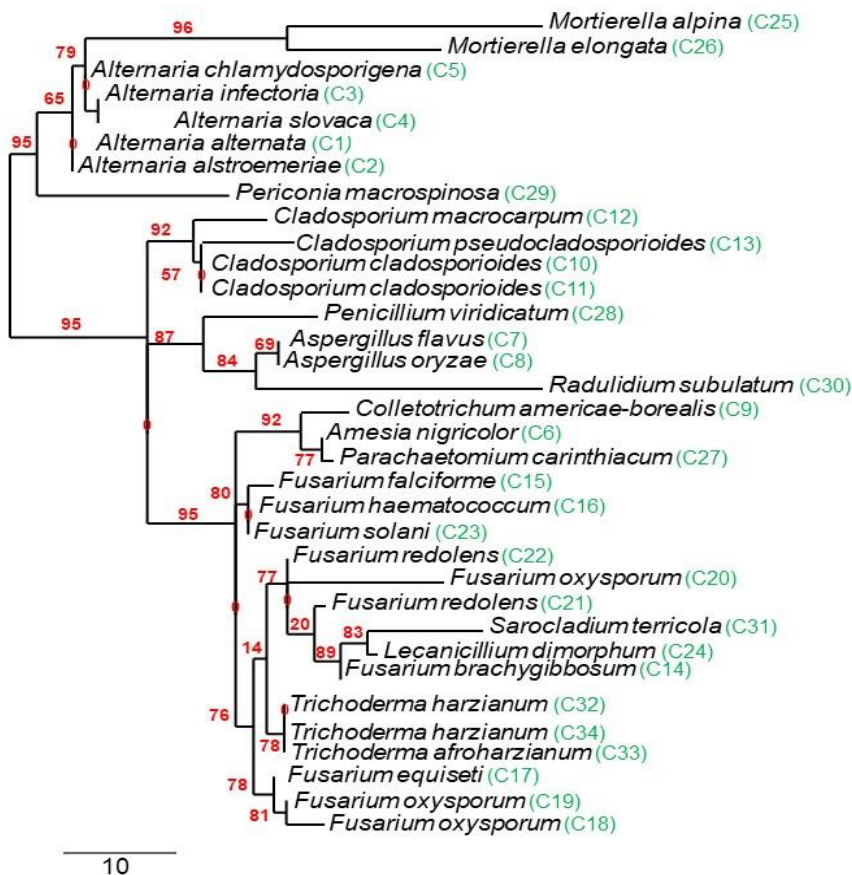
L'analyse phylogénétique basée sur le séquençage de la région ITS a révélé la présence de deux classes majoritaires : *Sordariomycetes* et *Dothideomycetes*, et deux classes minoritaires *Eurotiomycetes* et *Mortierellomycetes*. 14 genres différents sont présents et de manière inattendue, le genre *Fusarium* était le genre le plus dominant avec 12 isolats représentés par 10 espèces différentes (**Figure 34**).

Séquence ID	N° d'accèsion	NCBI best hit	Identité (%)	ITS (pb)	Nombre d'isolat	Origine	Milieu d'isolement	Classe
C1	OP629557	<i>Alternaria alternata</i> isolate BHU071	98.85%	536	1	Epi	PDA	Dothideomycetes
C2	OP629558	<i>Alternaria alstroemeriae</i> isolate LS-S-16	96.44%	508	1	Epi	TSA	Dothideomycetes
C3	OP629559	<i>Alternaria infectoria</i> isolate Z25	100%	555	9	Epi	PDA/TSA	Dothideomycetes
C4	OP629560	<i>Alternaria slovacica</i> isolate AS-S-7	96.73%	537	1	Epi	TSA	Dothideomycetes
C5	OP629561	<i>Alternaria chlamydosporigena</i> isolate LGM28	99.29%	575	1	Racine	PDA	Dothideomycetes
C6	OP629562	<i>Amesia nigricolor</i> strain 9Y-G28a	100%	495	1	Epi	PDA	Sordariomycetes
C7	OP629563	<i>Aspergillus flavus</i> clone EF_533	99.10%	560	1	Rhizosphère	PDA	Eurotiomycetes
C8	OP629564	<i>Aspergillus oryzae</i> strain HAK2-M26	99.26%	555	1	Rhizosphère	TSA	Eurotiomycetes
C9	OP629565	<i>Colletotrichum americanae-borealis</i> isolate XLKMH5WJ	95.39%	553	1	Epi	TSA	Sordariomycetes
C10	OP629566	<i>Cladosporium cladosporioides</i> isolate AS-S-14	96.80%	481	1	Epi	TSA	Dothideomycetes
C11	OP629567	<i>Cladosporium cladosporioides</i> isolate 74APRIL	99.19%	498	1	Rhizosphère	TSA	Dothideomycetes
C12	OP629568	<i>Cladosporium macrocarpum</i> isolate JK-F-05	95.02%	496	1	Rhizosphère	TSA	Dothideomycetes
C13	OP629569	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> isolate KUC1700	96.18%	495	1	Epi	PDA	Dothideomycetes
C14	OP629570	<i>Fusarium brachygibbosum</i> strain GW2	97.05%	506	1	Rhizosphère	PDA	Sordariomycetes
C15	OP629571	<i>Fusarium falciforme</i> isolate HB-R-31	97.00%	522	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C16	OP629572	<i>Fusarium haematococcum</i> isolate VOR10	97.73%	550	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C17	OP629573	<i>Fusarium equiseti</i> isolate BT1(2)	99.17%	496	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C18	OP629574	<i>Fusarium oxysporum</i> strain WZ-248	90.77%	477	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C19	OP629575	<i>Fusarium oxysporum</i> strain LZ070103	99.60%	522	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C20	OP629576	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate NJ3256	95.98%	479	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C21	OP629577	<i>Fusarium redolens</i> strain Fus 12	95.11%	492	1	Racine	TSA	Sordariomycetes
C22	OP629578	<i>Fusarium redolens</i> isolate 102	99.16%	504	3	Racine	PDA	Sordariomycetes
C23	OP629579	<i>Fusarium solani</i> strain GuangX9	99.26%	544	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C24	OP629580	<i>Lecanicillium dimorphum</i> isolate xiajiNamtso10	95.43%	543	1	Epi	PDA	Sordariomycetes
C25	OP629581	<i>Mortierella alpina</i> isolate DSM100289_DF19_RLCS11	93.71%	547	1	Rhizosphère	TSA	Mortierellomycetes
C26	OP629582	<i>Mortierella elongata</i> strain JL68	96.68%	547	1	Rhizosphère	TSA	Mortierellomycetes
C27	OP629583	<i>Parachaetomium carinthiacum</i> culture CBS:362.83	96.73%	515	1	Epi	TSA	Sordariomycetes
C28	OP629584	<i>Penicillium viridicatum</i> strain HE-MPwt2	94.64%	539	1	Epi	PDA	Eurotiomycetes
C29	OP629585	<i>Periconia macrospinoso</i> strain ZMXR33	99.41%	550	1	Racine	PDA	Dothideomycetes
C30	OP629586	<i>Radulidium subulatum</i>	98.94%	490	1	Epi	PDA	Dothideomycetes
C31	OP629587	<i>Sarocladium terricola</i> strain NG16	97.10%	527	1	Epi	TSA	Sordariomycetes
C32	OP629588	<i>Trichoderma harzianum</i> isolate Thar7	100%	590	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C33	OP629589	<i>Trichoderma harzianum</i> strain 1228	99.31%	590	1	Racine	PDA	Sordariomycetes
C34	OP629590	<i>Trichoderma harzianum</i> isolate IIIA3b	99.45%	554	1	Racine	PDA	Sordariomycetes

**Tableau 6. Caractéristiques moléculaires des souches fongiques isolées.** Ces caractéristiques incluent la séquence ID, le numéro d'accèsion, le pourcentage d'homologie avec la souche la plus proche sur NCBI et la longueur de la séquence ITS.



**Figure 33. Arbre phylogénétique intégrant tous les isolats bactériens isolés sur les milieux TSA et PDA (analyse basée sur le séquençage de l'ADNr 16S).** La phylogénie a été exécutée en utilisant la méthode UPGMA avec le modèle  $p$ -distance. L'analyse bootstrap de cet arbre a été exécutée avec 500 répétitions. La barre d'échelle 20 correspond à la substitution de nucléotide par position de séquence. La lettre B suivie d'un numéro (en bleu) représente la séquence ID des espèces les plus proches générées par blast sur NCBI et présentées dans le **Tableau 5**.



**Figure 34. Arbre phylogénétique de tous les isolats fongiques isolés sur les milieux PDA et TSA (analyse basée sur le séquençage de la région ITS).** La phylogénie a été exécutée selon les critères cités précédemment (**Figure 33**). La lettre C suivie d'un numéro (en vert) représente la séquence ID des espèces les plus proches générées par blast sur NCBI et présentées dans le **Tableau 6**.



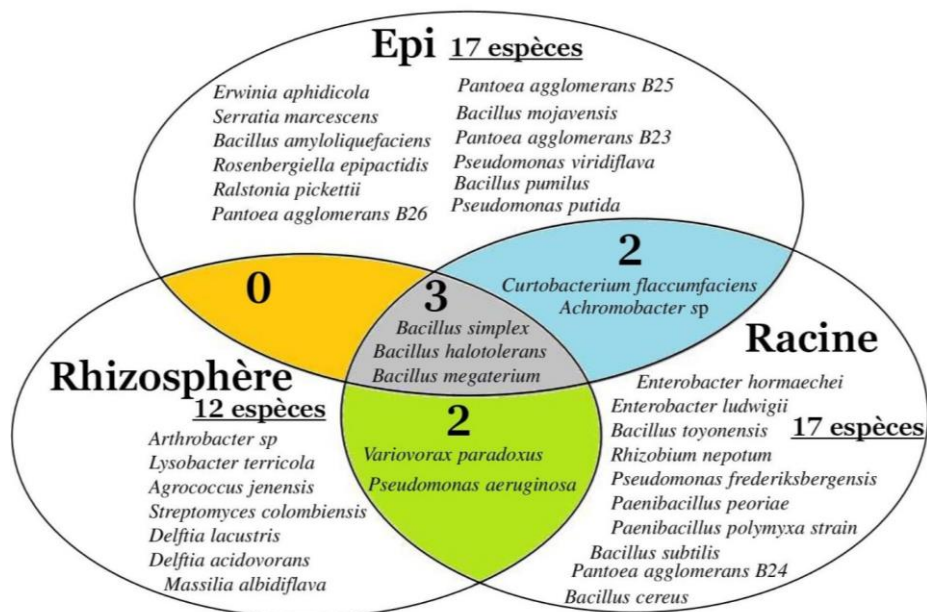
En terme de répartition des espèces selon l'origine de l'isolement, les espèces bactériennes sont plus abondantes dans l'épi et les racines avec 17 espèces pour chacun, et *Bacillus simplex*, *B. halotolerans* et *B. megaterium* ont été trouvées en commun entre les 3 sources d'isolement (**Figure 35**). Pour les champignons, les espèces identifiées sont plus abondantes au niveau de l'épi avec une dominance des espèces de genre *Alternaria* et au niveau racinaire avec une dominance des espèces de genre *Fusarium* (**Figure 36**).

Le séquençage de la région ITS des souches fongiques isolées sur le milieu sélectif TSM a permis d'identifier 111 isolats appartenant au genre *Trichoderma* répartis en 3 groupes : un groupe majoritaire de *Trichoderma harzianum* (67%) et deux groupes minoritaires de *Trichoderma* sp. (19%) et *Trichoderma lixii* (14%) (ce résultat sera discuté dans l'axe de recherche 2). De plus, 37 espèces autres que *Trichoderma* ont été isolées, dont les taux de similarité calculés par blast sur la base de donnée NCBI sont compris entre 90 et 100% (**Tableau 7**). Une analyse phylogénétique de ces 37 espèces a montré la présence de 4 classes : *Eurotiomycetes*, *Sordariomycetes*, *Dothideomycetes* et *Mortierellomycetes*. Le genre *Penicillium* a été le genre le plus dominant avec 13 espèces (**Figure 37**). Cet isolement a montré plus de diversité fongique en terme d'espèce et de nombre d'isolats par rapport au premier isolement non sélectif sur les milieux PDA et TSA. Cet état de fait serait inhérent à une composition très particulière de ce milieu sélectif, incluant notamment plusieurs inhibiteurs bactérien et fongiques (**Figure 38**). A l'échelle du genre, 10 genres ont été trouvés dont les plus dominants sont *Penicillium* (12 espèces), *Aspergillus* (8 espèces) et *Fusarium* (7 espèces).

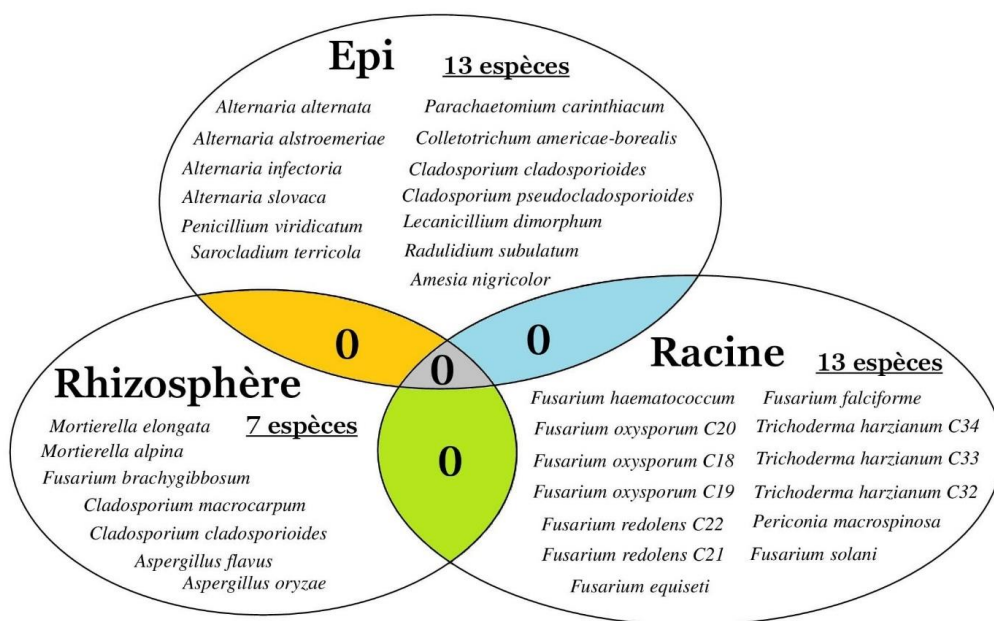
Le genre *Penicillium* est largement distribué dans les sols des régions cultivées, forestières, marines, désertiques et balnéaires. Plusieurs espèces de ce genre sont connues comme stimulateurs de croissance (PGPF), avec la capacité de produire des phytohormones, solubiliser des minéraux et améliorer la tolérance au stress biotique et abiotique chez plusieurs espèces végétales (Babu et al., 2015).

Des membres du genre *Aspergillus* sont connus pour sécréter des phytohormones et des sidérophores, et de solubiliser le phosphate. *A priori* en lien avec ces aptitudes particulières, l'inoculation d'*Aspergillus* sp isolé de la rhizosphère du blé s'est montrée efficace dans la stimulation de la croissance et la germination (Pandya et al., 2018).

En ce qui concerne les espèces de *Fusarium*, plusieurs d'entre elles sont considérées comme PGPF capables ainsi de stimuler la croissance et de renforcer l'immunité innée des plantes (Murali et al., 2021). Dans notre isolement, l'espèce *Fusarium oxysporum* a été isolée comme endophyte racinaire sur le milieu PDA et de la rhizosphère sur le milieu TSM. Le complexe d'espèces de *F. oxysporum* est très riche et par exemple, il comprend des espèces pathogènes et non pathogènes. Il n'est pas actuellement possible de discriminer les populations non pathogènes des populations pathogènes parmi nos souches de *Fusarium* isolées. Bien que leur inoculation sur graines n'engendre aucun symptôme au niveau des parties racinaires comme aériennes, l'observation de ces avirulences apparentes reste insuffisante pour affirmer que ces souches sont définitivement non-pathogènes ou pathogènes, quelle que soit l'espèce végétale (Steinberg et al., 2016). Une étude très approfondie et qui leur serait spécifiquement dédiée serait nécessaire pour statuer définitivement sur leur phénotype.



**Figure 35. Diagramme de Venn montrant le nombre et la répartition des espèces bactériennes isolées sur les milieux TSA et PDA selon l'origine des isolements. Les différentes couleurs montrent les espèces trouvées en commun entre les trois ensembles représentés par Épi, Racine et Rhizosphère**



**Figure 36. Diagramme de Venn montrant le nombre et la répartition des espèces fongiques isolées sur les milieux PDA et TSA selon l'origine des isolements. Aucune espèce n'a été trouvée en commun entre les trois ensembles représentés par Épi, Racine et Rhizosphère.**

Une connexion étroite entre les plantes et les communautés microbiennes est généralement observée dans la phyllosphère, la rhizosphère et les racines (Hirsch et Mauchline, 2014). Cette connexion est classée principalement en trois types d'interactions : rhizoshérique, endophytique et épiphytique. A l'instar de n'importe quelle plante, le blé interagit avec des microbes communs et spécifiques à une niche. A cet égard, certaines espèces isolées dans notre étude ont été rapportées comme des microbes communs tel est le cas des *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Paenibacillus polymyxa*, et *Pseudomonas aeruginosa* (Bhattacharyya et Jha, 2012 ; Verma et Suman, 2018). Le séquençage d'ADN à haut débit, la métagénomique et la métatranscriptomique ont facilité la détermination de la composition et des fonctions des communautés microbiennes associées à différentes cultures, ce qui a permis de comprendre l'influence des différents facteurs affectant ces communautés microbiennes. La structure du microbiome végétale change dynamiquement au fil du temps, de la germination de la graine semée à la floraison du plant. Au sein de l'endosphère et de la rhizosphère, la diversité des communautés bactérienne et fongique augmente avec l'âge et la sénescence, ce qui pourrait s'expliquer par la succession écologique au sein du microbiome végétal ou par le reflet des réponses aux métabolites produits différenciellement lors du développement et la maturation des plantes (Donn et al., 2014 ; Araujo et al., 2019 ; Gdanetz et Trail, 2017). Des espèces isolées dans notre étude et appartenant aux genres *Bacillus*, *Rhizobium*, *Alternaria* et *Fusarium* ont été rapportées par Araujo et al. (2019) comme dominants des stades initiaux de croissance. Notre choix de travailler sur une variété ancienne de blé, sélectionnée avant les années 1950 et cultivée dans un système d'agriculture biologique, peut être expliqué en partie par le fait que la communauté microbienne associée peut être influencée par le génotype de blé employé et par certains composés exogènes utilisés en agriculture conventionnelle. L'introduction de gènes de nanisme (*rht*) dans les cultivars de blé modernes pendant la révolution verte a entraîné des plantes avec des rendements accrus lorsqu'elles sont cultivées avec une fertilisation élevée (Hedden, 2003). Parallèlement, les microbiomes associés aux racines de blé ont considérablement changé à travers la sélection variétale, et cette sélection pourrait avoir affecté la capacité des variétés modernes à interagir avec des rhizobactéries bénéfiques (Kinnunen et al., 2020 ; Kavamura et al., 2020).

Le processus de domestication et la sélection variétale ont affecté la topologie des réseaux inter-organismes généraux, et en particulier avec les réseaux de cooccurrence microbienne, et le fait que les variétés locales soient plus connectées avec leur environnement suggèrerait une redondance fonctionnelle réduite dans le microbiome racinaire de cultivars modernes. Ces variétés locales représentent un grand réservoir d'endophytes potentiellement bénéfiques (Sun, 2020). De même, les applications massives d'engrais azotés inorganiques réduit la richesse et la diversité bactérienne, conduisant à une structure moins stable de la communauté bactérienne (Kavamura et al., 2018).

Le terme « core microbiome » ou microbiote de base fait référence à un sous-ensemble important et actif du microbiote associé à l'hôte qui non seulement favorise la croissance mais aussi la résistance face à des phytopathogène (Banerjee et al., 2018 ; Hassani et al., 2018 ; Toju et al., 2018). La détermination de ce microbiote de base est une tâche difficile vu l'absence d'une méthode d'étude appropriée, mais notre stratégie adoptée et qui

Séquence ID	N° d'accension	NCBI best hit	Identité (%)	ITS (pb)	Nombre d'isolat	Origine	Milieu d'isolement	Classe
DS1	OP647316	<i>Aspergillus sp. isolate A1</i>	99.62%	542	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS2	OP647317	<i>Aspergillus carneus strain 5</i>	99.62%	523	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS3	OP647318	<i>Aspergillus sp. MA-2014</i>	99.44%	546	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS4	OP647319	<i>Aspergillus carlsbadensis strain CBS 123894</i>	99.25%	554	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS5	OP647320	<i>Aspergillus parasiticus isolate ASPpar1</i>	99.25%	539	4	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS6	OP647321	<i>Aspergillus ustus strain LL-J-1</i>	99.06%	544	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS7	OP647322	<i>Aspergillus insuetus strain CGMCC 3.05503</i>	99.44%	543	3	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS8	OP647323	<i>Aspergillus flavipes strain rubem C8b</i>	99.63%	552	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS9	OP647324	<i>Acremonium furcatum genomic DNA sequence</i>	98.84%	522	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS10	OP647325	<i>Cladosporium sp. isolate C61</i>	99.23%	517	1	Rhizosphère	TSM	<i>Dothideomycetes</i>
DS11	OP647326	<i>Fusarium clavum strain JAMX26</i>	99.60%	497	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS12	OP647327	<i>Fusarium oxysporum isolate Aconitum carmichaelii Debx</i>	99.41%	506	2	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS13	OP647328	<i>Fusarium oxysporum isolate MR4003</i>	99.60%	502	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS14	OP647329	<i>Fusarium oxysporum strain WZ-175</i>	99.40%	521	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS15	OP647330	<i>Fusarium oxysporum strain FSD1</i>	99.60%	520	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS16	OP647331	<i>Fusarium brachygibbosum isolate SKF19</i>	100%	509	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS17	OP647332	<i>Fusarium sp. isolate HZ-6</i>	99.60%	499	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS18	OP647333	<i>Mortierella alpina strain 64</i>	99.51%	614	2	Rhizosphère	TSM	<i>Mortierellomycetes</i>
DS19	OP647334	<i>Mortierella alpina isolate MIAE07710</i>	99.67%	614	1	Rhizosphère	TSM	<i>Mortierellomycetes</i>
DS20	OP647335	<i>Mortierella alpina isolate DSM100289_DF19_RLCS11</i>	99.84%	615	2	Rhizosphère	TSM	<i>Mortierellomycetes</i>
DS21	OP647336	<i>Niesslia stellenboschiana CBS 145531</i>	90.50%	531	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS22	OP647337	<i>Penicillium canescens strain F334</i>	99.63%	537	2	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS23	OP647338	<i>Penicillium canescens culture CBS:130217 strain CBS 130217</i>	99.81%	535	2	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS24	OP647339	<i>Penicillium griseofulvum strain PG3</i>	100%	536	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS25	OP647340	<i>Penicillium griseofulvum genomic DNA</i>	99.62%	536	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS26	OP647341	<i>Penicillium griseofulvum isolate VIBENF4</i>	99.44%	537	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS27	OP647342	<i>Penicillium jensenii isolate MI664</i>	99.81%	533	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS28	OP647343	<i>Penicillium fellutanum strain CBS 118477</i>	99.80%	558	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS29	OP647344	<i>Penicillium gallaicum culture CBS:167.81</i>	99.25%	534	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS30	OP647345	<i>Penicillium sp. strain MY72</i>	99.08%	546	5	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS31	OP647346	<i>Penicillium parvum strain FS130</i>	99.24%	537	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS32	OP647347	<i>Penicillium clavigerum culture CBS:129128 strain CBS 129128</i>	98.15%	522	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS33	OP647348	<i>Penicillium canescens</i>	99.62%	539	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS34	OP647349	<i>Penicillium griseofulvum strain P-1707</i>	99.63%	553	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS35	OP647350	<i>Plectosphaerella cucumerina isolate y52</i>	99.80%	495	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>
DS36	OP647351	<i>Talaromyces sp. strain MQD11-1</i>	99.28%	560	1	Rhizosphère	TSM	<i>Eurotiomycetes</i>
DS37	OP647352	<i>Thelonectria truncata isolate 8942</i>	99.44%	536	1	Rhizosphère	TSM	<i>Sordariomycetes</i>

**Tableau 7. Caractéristiques moléculaires des souches fongiques isolées sur milieu sélectif TSM.** Ces caractéristiques incluent la séquence ID, le numéro d'accension, le pourcentage d'homologie avec la souche la plus proche sur NCBI et la longueur de la séquence ITS.

consiste à récupérer des représentants de ce microbiote à l'aide de méthodes de culture dépendantes puis tester leurs capacités fonctionnelles à la fois *in vitro* et *in planta* serait une stratégie opportune pour le développement de nouveaux inoculants. L'absence de certains genres dans notre étude est soutenue par le fait que dans les études antérieures aucun genre n'a été trouvé en commun, contrairement aux genres *Massilia* et *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Pantoea* et *Variovorax* cités ici qui ont été rapportés dans 60 et 50% d'études respectivement. Les études de Rojas et al. (2020) ont montré que lorsque le blé est infecté par *Fusarium*, un changement de la dynamique de colonisation des champignons endophytes se produit. Certains genres tels que *Cladosporium* se sont avérés compétitifs empêchant le développement de la maladie. Dans notre étude, nous avons relevé la présence de deux espèces de ce genre au niveau de l'épi qui sont *Cladosporium cladosporioides* et *C. pseudocladosporioides*.

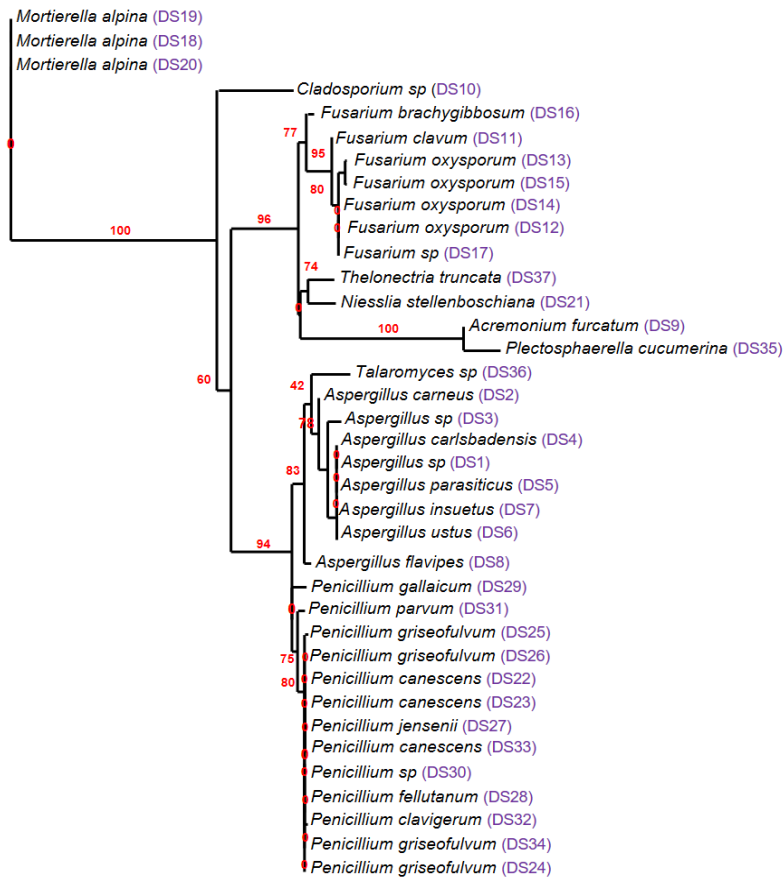
La rhizosphère est la niche la plus étudiée, suivie de la phyllosphère. Le microbiome des épis de blé est moins bien documenté. La transmission verticale du microbiome du blé a été évaluée et certaines souches appartenant au genre *Erwinia* seraient transmises verticalement par les graines. Dans notre étude, 5 souches d'*Erwinia aphidicola* ont été isolées au niveau de l'épi. A cet égard, il est important de souligner que cette espèce est parmi plusieurs espèces indicateurs caractéristiques des parties aériennes (Huang et al., 2016 ; Comby et al., 2016).

Les communautés microbiennes isolées influencent la santé et la croissance de leur hôte. Le fait que ces communautés soient associées avec le blé suggère qu'elles y développeraient des activités promotrices de croissance (PGP). Ces activités PGP peuvent être à action directe à travers la production de phytohormones telles que l'acide abscissique, l'acide indole 3-acétique (IAA), la cytokinine, la gibbérelline et l'éthylène, la solubilisation des nutriments (azote, phosphore, potassium et zinc), la fixation de l'azote et la production de sidérophores, ou aux actions indirectes en protégeant les plantes des infections et des stress environnementaux abiotiques *via* la production d'enzymes lytiques (Cellulases, Chitinases, Protéases, etc.), de composés volatiles (ammoniac, acide cyanhydrique) et de métabolites secondaires bioactifs et toxiques (Saraf et al., 2011 ; Tyc et al., 2017).

Plusieurs espèces isolées dans notre étude ont été décrites dans la littérature comme étant aptes à favoriser la croissance des plantes. Les propriétés PGP spécifiques de certaines espèces couramment associées au blé sont exposées dans les **Tableaux 8 et 9**.

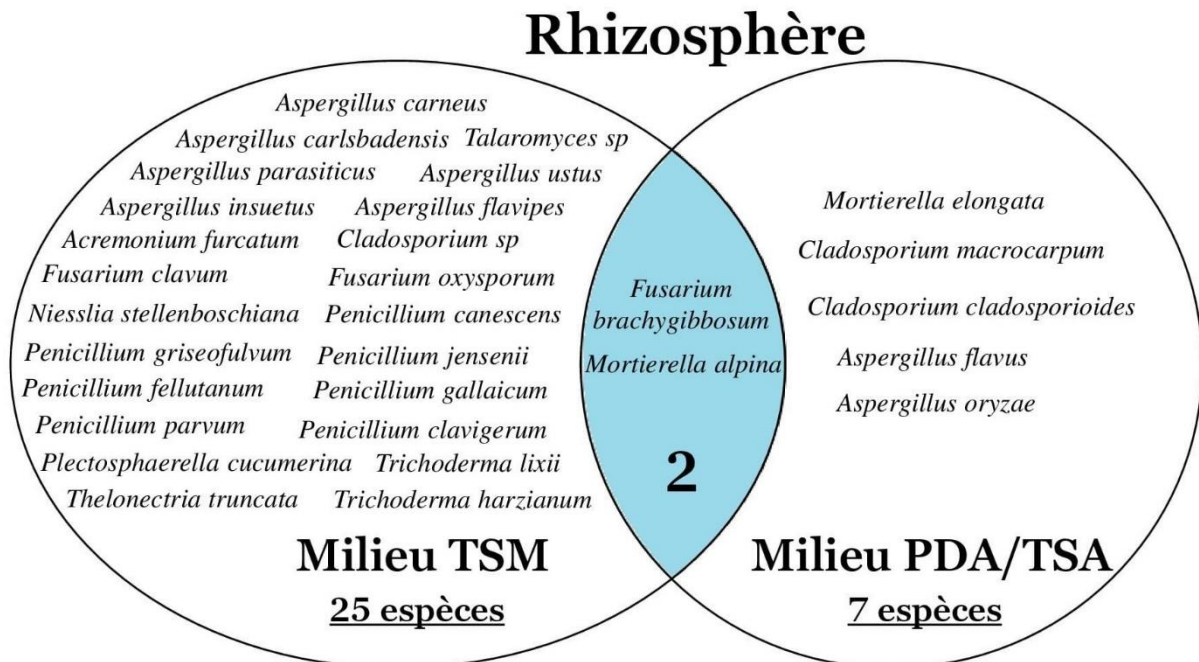
## **Conclusion et perspectives**

La compréhension de la structure, de la diversité et des fonctions des communautés microbiennes associées au blé -et aux facteurs qui les accompagnent- a été l'objectif de nombreuses études au cours de ces dernières années. Ces microbiomes interviennent dans divers rôles bénéfiques, et l'exploitation de ces rôles offre plusieurs avantages par rapport aux approches en cours et intégrées à la plupart des programmes d'amélioration des cultures avec en particulier l'utilisation excessive d'engrais et de pesticides. En effet, ces intrants fertilisants et phytosanitaires restent -malheureusement- les piliers fondamentaux des systèmes agraires pour en assurer les rendements et la protection.



**Figure 37. Arbre phylogénétique des isolats fongiques isolés sur le milieu TSM (analyse basée sur le séquençage de la région ITS).** La phylogénie a été exécutée selon les critères cités précédemment (**Figure 33**). Les lettres DS suivies d'un numéro (en violet) représentent la séquence ID des espèces les plus proches générées par blast sur NCBI et présentées dans le **Tableau 7**.

20



**Figure 38. Diagramme de Venn exposant les différentes espèces fongiques isolées à partir de la rhizosphère.** La partie commune en bleu indique les espèces trouvées en commun entre les milieux de culture TSM et PDA/TSA.

L'isolement de plusieurs représentants du microbiome de blé *via* les deux approches d'isolement réalisées dans cette étude nous a permis d'avoir non seulement une idée sur la composition de la communauté bactérienne et fongiques existantes mais aussi et surtout l'obtention de potentiels candidats biofertilisants et bioprotecteurs dont certains seront valorisés dans les deux chapitres qui suivent et qui traitent l'amélioration de la croissance du blé et la résistance contre *Fusarium culmorum*, un cryptogame provoquant de nombreuses maladies économiquement importantes chez le blé en Tunisie.

**Tableau 8. Genres bactériens isolés dans cette étude ayant des fonctions PGP associés au blé et à d'autres plantes et cités dans la littérature.**

<b>Genre</b>	<b>Fonction</b>	<b>Source</b>	<b>Référence</b>
<i>Achromobacter</i>	Tolérance au stress salin, production d'acide indole-3-acétique (IAA), fixation de l'azote et solubilisation du phosphate	Endosphère du blé	Barra et al. (2014) ; Jha et Kumar (2009)
<i>Agrococcus</i>	Production d'IAA, de sidérophores et solubilisation du phosphate	Déchets de mine de phosphate	Mghazli et al. (2022)
<i>Arthrobacter</i>	Solubilisation du phosphate et du zinc, production d'IAA, de sidérophores, d'ammoniac et de l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACCD), fixation de l'azote et biocontrôle de <i>Fusarium graminearum</i>	Rhizosphère du blé	Verma et al. (2015) ; Rilling et al. (2018)
<i>Bacillus</i>	Solubilisation du phosphate, du potassium et du zinc, production d'IAA, de sidérophores, d'acide gibbérellique (AG), de cyanure d'hydrogène (HCN), d'ammoniac, d'ACCD, de protéase et de cellulase, fixation de l'azote et biocontrôle de <i>Fusarium graminearum</i>	Rhizosphère et endosphère du blé	Verma et al. (2015) ; Rilling et al. (2018) ; Gontia et al. (2017)
<i>Curtobacterium</i>	Tolérance à la sécheresse, au stress osmotique et à la salinité	Rhizosphère d'olivier	Schillaci et al. (2022)
<i>Delftia</i>	Production d'IAA et solubilisation du phosphate	Endosphère du blé	Woźniak et al. (2019)
<i>Enterobacter</i>	Tolérance au stress salin et fixation de l'azote	Rhizosphère du blé	Ji et al. (2020)
<i>Erwinia</i>	Production d'ammoniac, de sidérophores, d'IAA, d'ACCD et solubilisation du phosphate	Sol de ferme biologique	Sagar et al. (2018)
<i>Lysobacter</i>	Lutte biologique contre la fusariose de l'épi du blé	Endosphère d'herbe	Jochum et al. (2006)
<i>Massilia</i>	Production d'IAA, de sidérophores et de protéase	Endosphère de <i>Tylosema esculentum</i>	Chimwamurombe et al. (2016)
<i>Paenibacillus</i>	Solubilisation du phosphate et production d'ammoniac et d'IAA	Rhizosphère du blé	Rana et al. (2011)
<i>Pantoea</i>	Solubilisation du zinc, production d'IAA, de sidérophores, de GA, de HCN, d'ammoniac et d'ACCD, fixation de l'azote et biocontrôle de <i>Fusarium graminearum</i>	Rhizosphère du blé	Verma et al. (2015)



<b><i>Pseudomonas</i></b>	Solubilisation du phosphate et du zinc, production d'IAA, de sidérophores, d'AG, de HCN, d'ammoniac, de protéases, de lipases et d'ACCD, fixation de l'azote et biocontrôle de <i>Fusarium graminearum</i>	Rhizosphère du blé	Verma et al. (2015) ; Gontia et al. (2017)
<b><i>Rhizobium</i></b>	Production d'IAA, de HCN, d'ammoniac et tolérance aux métaux lourds	Rhizosphère du blé	Singh et Lal. (2016)
<b><i>Serratia</i></b>	Tolérance au stress salin	Endosphère de <i>Persea americana</i>	Barra et al. (2014)
<b><i>Streptomyces</i></b>	Solubilisation du phosphate, production de sidérophores, d'IAA et d'enzymes extracellulaires (Chitinases, Protéases, Phytases et Cellulases)	Rhizosphère du blé	Jog et al. (2012)
<b><i>Variovorax</i></b>	Solubilisation du phosphate, production d'ACCD, de sidérophores, d'IAA et tolérance au cadmium	Rhizosphère de <i>Brassica juncea</i>	Zheng et al. (2019) ; Belimov et al. (2005)

**Tableau 9. Genres fongiques isolés dans cette étude ayant des fonctions PGP associés au blé et à d'autres plantes et cités dans la littérature.**

<b>Genre</b>	<b>Fonction</b>	<b>Source</b>	<b>Référence</b>
<b><i>Alternaria</i></b>	Production d'IAA, activité antagoniste contre des espèces de <i>Fusarium</i>	Endosphère de <i>Ephedra pachyclada</i> et de <i>Onobrychis viciifolia</i>	Khalil et al. (2021) ; Al-Rashdia et al. (2020)
<b><i>Amesia</i></b>	Solubilisation du phosphate et production des enzymes comme des Amylases et des Cellulases	Endosphère de <i>Vaccinium</i> sect. <i>Cyanococcus</i>	Li et al. (2023)
<b><i>Aspergillus</i></b>	Solubilisation du phosphate	Endosphère de <i>Ephedra pachyclada</i>	Khalil et al. (2021)
<b><i>Acremonium</i></b>	Production d'IAA, de sidérophores et solubilisation du phosphate, activité antifongique contre <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> et <i>Fusarium fujikuroi</i>	Bulbes de <i>Lilium davidii</i>	Khan et al. (2021)
<b><i>Colletotrichum</i></b>	Production d'IAA, activité antifongique contre <i>Fusarium oxysporum</i>	Endosphère de <i>Justicia brandegeana</i>	Santos et al. (2022)
<b><i>Cladosporium</i></b>	Activité antifongique contre <i>Fusarium graminearum</i> , production	Sol	Jäger et al. (2022)

	d'enzymes hydrolytiques, d'IAA, solubilisation du zinc et du phosphate		
<b><i>Fusarium</i></b> (non pathogène)	Solubilisation du phosphate et amélioration de la croissance dans des conditions de stress salin	Endosphère de soja	Radhakrishnan et al. (2015)
<b><i>Lecanicillium</i></b>	Production d'IAA, de sidérophores, d'ammoniac, d'amylase, de cellulase et de protéase, solubilisation du phosphate et du zinc	Cadavres de thrips de la cardamome	Senthil et al. (2018)
<b><i>Mortierella</i></b>	Production de sidérophores, d'IAA, d'enzymes lytiques (Chitinases, Cellulases et Pectinases) et solubilisation du phosphate	Sols agricoles (sols en vrac et sols rhizosphériques)	Ozimek et Hanaka (2020)
<b><i>Penicillium</i></b>	Production d'IAA et solubilisation du phosphate	Endosphère de <i>Ephedra pachyclada</i>	Khalil et al. (2021)
<b><i>Periconia</i></b>	Amélioration des performances des plantes sous conditions de stress salin	Endosphère de <i>Festuca rubra subsp. pruinosa</i>	Pereira et al. (2021)
<b><i>Plectosphaerella</i></b>	Amélioration de la croissance, de la teneur en chlorophylle, en sucre et de l'activité enzymatique clé pendant le métabolisme du sucre et de l'azote	Endosphère de <i>Onobrychis viciifolia</i>	Junker et al. (2012) ; Shi et al. (2009)
<b><i>Sarocladium</i></b>	Production de phytohormones, de sidérophores et solubilisation du phosphate	Endosphère de riz	Syamsia et al. (2021)
<b><i>Talaromyces</i></b>	Stimulation de la croissance par la production de composés volatils (b-caryophyllène)	Sol d'un champ agricole	Yamagiwa et al. (2011)
<b><i>Trichoderma</i></b>	Production d'IAA, de sidérophores, de composés organiques volatils à activité antifongique et solubilisation du phosphate	Rhizosphère de <i>Panax ginseng</i> et de <i>Pinus koraiensis</i>	Joo et Hussein (2022)



## ***Axe de recherche 2***

### ***« Trichoderma »***

***Assessment of Tunisian Trichoderma isolates  
on wheat seed germination, seedling growth  
and Fusarium Seedling Blight suppression***

## Préambule

Les produits chimiques (*ie* lutte chimique) sont encore -trop- abondamment utilisés pour combattre les maladies des plantes. Leur pulvérisation abusive participe à l'amenuisement de la biodiversité enregistrée. De plus, il favorise le développement de pathogènes résistants à ces fongicides, leur activité devenant souvent caduque. La lutte biologique, et plus précisément la lutte microbiologique, est d'ores et déjà considérée comme étant une alternative durable et très attendue à la lutte chimique pour le contrôle d'agents (phyto-)pathogènes et de bioagresseurs. Cette démarche agronomique repose sur l'emploi d'agents antagonistes (encore appelés prédateurs ou parasitoïdes) qui s'attaquent à des espèces dites « proies » ou hôtes (ici les agents phytopathogènes) pour en contenir, voire limiter au mieux leur expansion et infection. Cela se traduit par la mise en place d'interactions directes et/ou indirectes entre les protagonistes qui, *in fine*, s'appuient essentiellement sur la fondation d'un réseau trophique entre organismes et de son exploitation. Ces interactions se matérialisent par le déploiement de mécanismes moléculaires variés, dont certains sont ici étudiés.

Parmi les micro-organismes antagonistes exploités pour le biocontrôle des maladies des plantes figure en pole position le genre *Trichoderma* (Woo et al., 2023). Il représente plus de 90% des luttes biologiques. Les espèces communément employées sont *T. virens*, *T. viride*, et surtout *T. harzianum* (Chang et al., 1986 ; Keswani et al., 2013). Le genre *Trichoderma* fait partie des mycètes omniprésents naturellement dans le sol. De même, certaines espèces sont des endophytes facultatifs au niveau des racines ou des feuilles. Depuis plusieurs décennies, quelques espèces sont appliquées sur des cultures céréalières, légumières ou fruitières, en raison de leurs potentiels biofertilisants (Macías-Rodríguez et al., 2018 ; Esparza-Reynoso et al., 2021 ; Awad-Allah et al., 2022) et biopesticide (Benitez et al., 2004 ; Contreras-Cornejo et al., 2016). Ces espèces peuvent ainsi assurer une stabilité des rendements dans des contextes environnementaux biotique et abiotique défavorables. L'aptitude biopesticide traduit l'action de biocontrôle des agents phytopathogènes. Elle se manifeste par l'établissement de différents mécanismes comme la compétition pour l'espace et les nutriments avec les phytopathogènes, des actions myco-parasitaires directes (où le phytopathogène devient « l'hôte proie »), la production d'enzymes lytiques et de molécules antiseptiques diffusibles et/ou volatiles tuant et/ou inhibant la croissance des phytopathogènes, et l'élicitation rapide de l'accumulation de défenses végétales (Halifu et al., 2020 ; Mendoza-Mendoza et al., 2018 ; Kaur et al., 2022). Concomitamment, des espèces de *Trichoderma* ont la capacité de modifier la rhizosphère et, à ce titre, elles sont souvent décrites comme de puissants agents biofertilisateurs pour les plantes. En effet, ces mycètes dégradent des composés inorganiques et organiques complexes présents dans le sol. Ces dégradations correspondent à des digestions extracellulaires assurées par des sécrétions d'hydrolases, et elles améliorent l'absorption racinaire de certains métabolites (*ie* nutriments) par les plantes. *In fine*, ce levier certes favorable pour la croissance des plantes potentialise l'ensemble des performances physiologiques de celles-ci, dont son immunité innée.

Il s'avère que ces *Trichoderma* développent alors un double bénéfice pour les plantes avec qui ils sont en contact, et à ce titre ils sont qualifiés d'agents bénéfiques aux actions de biocontrôle (BCA) et de promotion de croissance (PGP). Ce sont ces aptitudes bénéfiques pour les plantes qui sont explorées ici.

L'application de *Trichoderma* modèle la rhizosphère, déjà directement par ses propres activités métaboliques, mais aussi en interagissant avec le microbiote environnant qui, lui-même, influence intrinsèquement et profondément cet environnement éminemment complexe. Ce sont néanmoins ces interrelations bénéfiques qui offrent l'opportunité d'améliorer les performances de croissance et immunes de plants d'intérêt agronomique, comme le blé, avec pour ambition de réduire l'emploi massif des engrais et des pesticides chimiques. Les potentiels bénéfiques de ces *Trichoderma* ont été démontrés contre plusieurs agents phytopathogènes, dont les *Fusarium* spp. (Li et al., 2018 ; Guo et al., 2019 ; Halifu et al., 2020 ; Rao et al., 2022). Parmi les quelques espèces de ce genre dont certaines sont des agents cryptogamiques majeurs qui sévissent sur le blé, *Fusarium culmorum* est responsable de la brûlure des plantules et de l'épi, et la pourriture du pied (Gargouri et al., 2001 ; Hollaway et al., 2013). Il contamine également les grains, les rendant impropres à la consommation par la présence de nombreuses mycotoxines. Les infestations fusariennes occasionnent encore des pertes significatives sur le pourtour méditerranéen sud, dont la Tunisie. Le manque de cultivars de blé entièrement résistants aux *Fusarium* a pour conséquence un emploi massif de fongicides, une option dont les répercussions négatives sur l'environnement sont dévastatrices et manifestes.

Toutes les caractéristiques phénotypiques susmentionnées font le succès du genre *Trichoderma* comme un moyen de lutte phytosanitaire relativement fiable, et dont son utilisation mérite d'être valorisée et déployée plus encore dans un contexte céréalier comme le blé (Sarrocchio et al., 2013 ; Stummer et al., 2022 ; De Palma et al., 2019). A ce titre, les études sur la diversité des espèces de *Trichoderma* présentent au sein d'un « microbiote céréalier » et leur valorisation dans la gestion intégrée des maladies du blé devraient être systématiquement promues plus encore. Cependant, l'objectif de promouvoir l'utilisation de ces souches bénéfiques dans un contexte de préservation de l'environnement ne sera totalement atteint que si et seulement si leur aire d'application correspond à leur aire d'origine. De même, quelques souches de *Trichoderma* (*T. harzianum* principalement) sont connues pour diminuer les infestations de *F. culmorum* (Kthiri et al., 2020,2021 ; Boamah et al., 2021). Cependant, en dépit de nombreuses recherches ciblant les activités « antimicrobiennes » des *Trichoderma*, la connaissance des mécanismes liés aux aptitudes myco-parasitaires et d'antibiose directes, puis élicitrices des défenses végétales responsables de la réduction de l'incidence de la maladie après un traitement avec *Trichoderma* est très incomplète. En effet, la plupart des études traitent sur le devenir de l'interaction des protagonistes tout en omettant d'introduire l'implication d'acteurs moléculaires possibles chez l'agent de biocontrôle et/ou la plante hôte infestée (ici le blé).

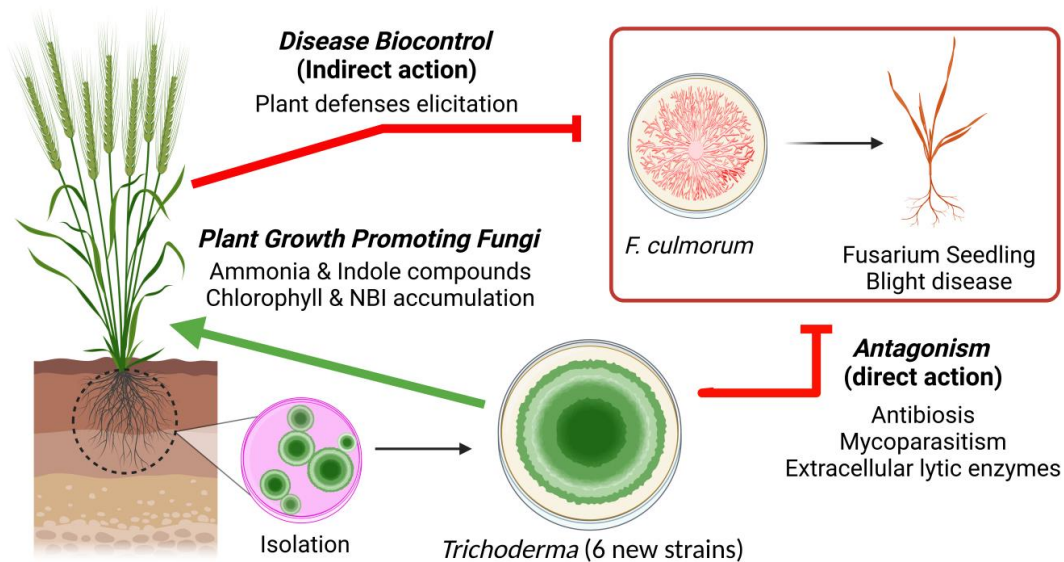
Et pourtant, quelques données montrent que durant la pénétration de *Trichoderma harzianum* au niveau du système racinaire chez le blé, la croissance des plants est favorisée et corrélée à la modulation du système de résistance induite (SIR) impliquant des phytohormones telles l'acide jasmonique (JA), et l'éthylène (Et) (Contreras-Cornejo et al., 2016 ; Pedrero-Méndez et al., 2021 ; Illescas et al., 2021). Cependant, le dialogue entre *Trichoderma* et les plantes est un processus dynamique complexe qui dépend de la souche employée, de la concentration utilisée, du matériel végétal, du stade de développement de la plante et du temps d'interaction ciblés (Hermosa et al., 2012 ; Pandey et al., 2016 ; Ben Amira et al., 2017). En outre, les effets de traitements à base de *Trichoderma* sur l'expression des gènes de défense de la plante varient en fonction du type de tissu analysé et de l'âge de la plante. Et encore aujourd'hui, bien que le blé soit une des plantes agronomiques majeures à l'échelle mondiale, les connaissances sur les interactions entre *Trichoderma* et le blé sont paradoxalement très peu détaillées, voire inexistantes dès lors où elles s'adressent à des souches issues d'un biotope particulier (ici des structures de cultures céréalières biologiques) en interaction avec des semences de blé couramment utilisées dans ces mêmes biotopes.

Le genre *Trichoderma* fait partie de la diversité microbienne qui a été mise en lumière au niveau du sol et de la rhizosphère du blé et qui est exposée dans le chapitre précédent. En s'appuyant sur les connaissances moléculaires des aptitudes PGP et BCA de certaines souches de *Trichoderma*, et parce que ces agents biologiques sont aujourd'hui acceptés par le secteur agricole et ornemental dans la protection des plantes contre de nombreuses maladies, notre objectif fut alors de valoriser certaines des souches identifiées. Quatre axes ont structuré nos travaux: i) isoler spécifiquement un grand nombre de souches de *Trichoderma* et d'en évaluer la diversité génétique; ii) identifier avec le plus de précision possible le rang espèce de quelques souches représentatives de la diversité susmentionnée; iii) évaluer les aptitudes promotrices de germination de grains et de croissance de jeunes plants, iv) évaluer les aptitudes de biocontrôle vis-à-vis de *F. culmorum* au travers des activités antagonistes directes en milieu axénique (myco-parasitisme et antibiose), et indirectes sur plants avec l'élicitation des performances immunes des plants. Les performances immunes furent appréciées par un suivi des expressions transcriptionnelles de gènes codant un large panel de défenses végétales, apparentées à différentes voies métaboliques : métabolismes « secondaires », protéines PR, stress oxydant, balances phyto-hormonales, et récepteurs et transduction du signal. Ces défenses ont été analysées lors des interactions Blé-*Trichoderma* et Blé-*Trichoderma*-*F. culmorum*.

Notre objectif est au final pluriel. Nous avons tenté d'enrichir les connaissances sur la diversité des espèces de *Trichoderma* d'un biotope spécifique en Tunisie et qui compose l'environnement rhizosphérique en contact direct avec les racines d'une espèce de blé cultivé dans un contexte de culture biologique. A partir de cette diversité, nous souhaitons identifier de nouvelles souches aux aptitudes biofertilisantes et biopesticides significatives sur blé.

Parallèlement et d'un point de vue plutôt fondamental, nous avons identifié les mécanismes d'attaque des souches de *Trichoderma* isolées sur *F. culmorum*, ainsi que certains des mécanismes moléculaires qui seraient potentiellement élicités chez le blé par ces souches et qui participeraient à limiter significativement l'expansion et/ou l'agressivité de *F. culmorum* sur plant.

L'ensemble des résultats générés dans cet axe de recherche est intégralement exposé dans l'article qui suit.



**Résumé graphique de l'article « Assessment of Tunisian *Trichoderma* isolates on wheat seed germination, seedling growth and *Fusarium* Seedling Blight suppression »** (Source personnelle, réalisé avec BioRender). Ce graphique illustre l'effet des 6 souches de *Trichoderma* sur la stimulation de la croissance, l'expression des défenses végétales et la suppression de la fusariose des semences chez le blé.



Article

# Assessment of Tunisian *Trichoderma* Isolates on Wheat Seed Germination, Seedling Growth and Fusarium Seedling Blight Suppression

Mouadh Saadaoui <sup>1,2,3</sup>, Mohamed Faize <sup>4</sup>, Ludovic Bonhomme <sup>5</sup>, Noura Omri Benyoussef <sup>3,6</sup>, Mohamed Kharrat <sup>3</sup>, Hatem Chaar <sup>3,6</sup>, Philippe Label <sup>1</sup> and Jean-Stéphane Venisse <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, INRAE, PIAF, 63000 Clermont-Ferrand, France; mouadh.saadaoui@doctorant.uca.fr (M.S.)

<sup>2</sup> Université de Tunis El Manar, Campus Universitaire Farhat Hached, B.P. n° 94—ROMMANA, Tunis 1068, Tunisia

<sup>3</sup> Field Crops Laboratory, National Institute for Agricultural Research of Tunisia (INRAT), Hedi Karray Street, El Menzah, Ariana 1004, Tunisia

<sup>4</sup> Laboratory of Plant Biotechnology, Ecology and Ecosystem Valorization URL-CNRST 10, Faculty of Sciences, University Chouaib Doukkali, El Jadida 24000, Morocco

<sup>5</sup> UMR 1095 Génétique Diversité Ecophysiologie des Céréales, INRAE, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>6</sup> National Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), Tunis 1082, Tunisia

\* Correspondence: j-stephane.venisse@uca.fr



**Citation:** Saadaoui, M.; Faize, M.; Bonhomme, L.; Benyoussef, N.O.; Kharrat, M.; Chaar, H.; Label, P.; Venisse, J.-S. Assessment of Tunisian *Trichoderma* Isolates on Wheat Seed Germination, Seedling Growth and Fusarium Seedling Blight Suppression. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061512>

Academic Editors: Tim J. Dumonceaux and Michael J. Bidochka

Received: 11 April 2023

Revised: 25 May 2023

Accepted: 1 June 2023

Published: 6 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Beneficial microorganisms, including members of the *Trichoderma* genus, are known for their ability to promote plant growth and disease resistance, as well as being alternatives to synthetic inputs in agriculture. In this study, 111 *Trichoderma* strains were isolated from the rhizospheric soil of Florence Aureore, an ancient wheat variety that was cultivated in an organic farming system in Tunisia. A preliminary ITS analysis allowed us to cluster these 111 isolates into three main groups, *T. harzianum* (74 isolates), *T. lixii* (16 isolates) and *T. sp.* (21 isolates), represented by six different species. Their multi-locus analysis (*tef1*, translation elongation factor 1; *rpb2*, RNA polymerase B) identified three *T. afroharzianum*, one *T. lixii*, one *T. atrobrunneum* and one *T. lentinulae* species. These six new strains were selected to determine their suitability as plant growth promoters (PGP) and biocontrol agents (BCA) against Fusarium seedling blight disease (FSB) in wheat caused by *Fusarium culmorum*. All of the strains exhibited PGP abilities correlated to ammonia and indole-like compound production. In terms of biocontrol activity, all of the strains inhibited the development of *F. culmorum* in vitro, which is linked to the production of lytic enzymes, as well as diffusible and volatile organic compounds. An in planta assay was carried out on the seeds of a Tunisian modern wheat variety (Khar) by coating them with *Trichoderma*. A significant increase in biomass was observed, which is associated with increased chlorophyll and nitrogen. An FSB bioprotective effect was confirmed for all strains (with *Th01* being the most effective) by suppressing morbid symptoms in germinated seeds and seedlings, as well as by limiting *F. culmorum* aggressiveness on overall plant growth. Plant transcriptome analysis revealed that the isolates triggered several SA- and JA-dependent defense-encoding genes involved in *F. culmorum* resistance in the roots and leaves of three-week-old seedlings. This finding makes these strains very promising in promoting growth and controlling FSB disease in modern wheat varieties.

**Keywords:** biostimulation; biofertilizer; biocontrol; plant defenses; phytohormones; VOCs; *Fusarium culmorum*

## 1. Introduction

Organic and chemical-free farming methods to control biotic pathogens and enhance yield are increasing in popularity and practice currently due to the growing concern about



the potential negative impact of synthetic chemicals used in conventional farming. This improved yield has been accompanied by modern breeding practices for half of the 20th century in order to select the most effective crop genotypes that take full advantage of farming inputs, thus limiting any potential added value coming from beneficial plant-microbe interactions [1,2]. Due to this, there is an urgent need to develop promising new ways to increase both crop performance and tolerance to biotic and abiotic factors without harming human health or the environment.

Worldwide, wheat is one of the major crops, providing food for about 35% of the world's population and making up 17% of the global cultivated area [3]. In Tunisia, cereals and their derivatives constitute the base of all diets and the main source of calories. Tunisia's average rate of wheat consumption per capita is 184 kg per year, making Tunisia one of the largest wheat consumers in the world, a rate which is expected to remain at the same level in the coming years [4,5].

Cereals are susceptible to fungal diseases such as Fusarium seedling blight (FSB) caused by *Fusarium* fungi, including *Fusarium culmorum*, the dominant pathogen in both Tunisia and the Mediterranean region [6]. FSB is responsible for extensive damage to growing seedlings; it can cause significant yield losses and impact the quality of the harvested grain resulting in reduced market value [7]. This disease is most severe in cool and wet conditions, which are common in the winter in Tunisia [8]. Symptoms of FSB include stunted seedlings, yellow leaves and root rot, as well as infected seeds which fail to germinate or die soon after germination. In some severe cases, the entire seedling can collapse and rot [7,9]. *F. culmorum* is a soil-borne fungus that can persist in the soil as chlamydospores for many years, and it can also survive in stubble residues of cereals and other grasses as hyphae [8,10]. This ability makes *F. culmorum* difficult to manage and has major implications for designing effective strategies for disease management. *F. culmorum* is capable of causing both FSB and Fusarium Head Blight (FHB) in wheat. FHB disease occurs in the spikes and is characterized by visible symptoms, such as reddish and scabby spikes, which can result in the accumulation of mycotoxins in the grains [11,12]. Control of FSB has received less attention than control of Fusarium head blight (FHB) because of the risk of mycotoxin contaminations of grain, even though FSB could provide a pathogen source for subsequent epidemics of FHB [12,13]. Control of FSB could be achieved by chemical, cultural and biological strategies [14,15]. Using pesticides as a seed treatment could be problematic because of the toxic residues associated with fungicides [16,17]. Some cultural practices may help reduce the fungal population in the soil, such as deep plowing or removing crop residues, but the effectiveness of these measures is limited due to the persistence of the pathogen in the soil [18]. Another management strategy, crop rotation, is not generally practiced in Tunisia because the market has always had a significant influence on the diversity of crops grown in the country. The aim of increasing food self-sufficiency has led to the promotion of certain crops; durum wheat, for example, is a dominant crop taking approximately 60% of the cereal growing area [19]. In addition, control of FSB has been challenging both due to the lack of fully resistant wheat cultivars and because Tunisia is now considered a hot spot for climate change [20].

The use of beneficial microorganisms which are isolated from soil or plant tissues to control plant pathogens and promote plant growth seems to be a very promising and cost-effective component of an integrated disease management plan for sustainable modern agriculture [21].

From this perspective, *Trichoderma*-based products are a segment that is growing in popularity in the agriculture industry, as *Trichoderma* spp. can help improve soil health and plant growth. These products are used for a variety of applications, including soil inoculants, seed treatments, biopesticides and biofertilizers. Indeed, *Trichoderma* spp. are common rhizospheric inhabitants, and the ability of certain species to colonize plant roots allows them to engage with their host in complex molecular dialogues that promote plant growth and productivity [22]. In addition, *Trichoderma* spp. are considered BioControl Agents (BCAs), conferring protection against a wealth of plant pathogens [23]. Multiple

molecular mechanisms have been suggested to be responsible for its biocontrol abilities, such as interference with the life cycles of plant pathogens by mycoparasitism (or hyperparasitism); using the secretion of antibiotics (volatile organic compounds, VOCs) and extracellular cell wall-degrading enzymes (CDWEs); competition for nutrients and space; chemical modification of the environmental conditions; and modulation of the host's innate immunity performance [24–28]. The local and systemic elicitations of the plant defensive responses are correlated with a significant increase in disease resistance against a broad spectrum of plant pathogenic fungi, such as various *Fusarium* spp. [29–34].

Some *Trichoderma* strains were isolated from Tunisian soil and plant habitats and were studied as beneficial agents in wheat [33,35]. However, the diversity of available beneficial strains is very limited, predominantly focused on some species that primarily belong to one of the five taxonomic sections of the “*Trichoderma harzianum* species complex” (THSC) [36–38]. This gap concerns all of the plant species of agronomic interest. In this respect, exploring the greater diversity of *Trichoderma* and evaluating their biocontrol abilities would be of great benefit in minimizing the pathogens spread in wheat. However, the success of a fungal biocontrol agent depends not only on the complex interactions it is able to establish with the plant host and its related pathogens but also on its aptitude to colonize a rhizospheric environment modeled by the crops already present, the soil structure and the remarkable endogenous microbial diversity.

Based on the hypothesis that ancient wheat genotypes could represent a source of beneficial fungi such as *Trichoderma*, we focused our research on Florence Aurore, an ancient wheat variety that was cultivated in an organic farming system in Tunisia, for this study. Our aim was to check this variety for the presence of beneficial *Trichoderma* species in the rhizosphere through isolation, molecular characterization (ITS, *tefl* and *rpb2*) and assessment of their plant growth promotion abilities (with the production of indole-like compounds, hydrogen cyanide, ammonia and lytic enzymes, or the solubilization of phosphate). In addition, the isolated strains were evaluated for their possible biocontrol activity against *F. culmorum*, in the context of Fusarium seedling blight, through dual confrontation assays and assessments of diffusible and volatile compound productions. Finally, to confirm these PGP and biocontrolling features, in planta experiments were conducted in greenhouse conditions on Khlar, one of the most marketed wheat varieties in Tunisia, followed by the quantification of defense-related gene expression in the leaves and roots to assess the potential of the *Trichoderma* isolates as plant immunity inducers. Our data provide a set of new Tunisian *Trichoderma* strains that could contribute to the use of field applications of *Trichoderma* fungus as a biocontrol agent.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Tunisian Sampling Location

Field sampling was conducted in May 2020. The study site was located in “Gousset el bey” in the governorate of Bizerte at 36.924096° N, 9.699089° E, in the northwestern part of Tunisia (Figure S1 in Supplementary Materials). This area is characterized by a warm Mediterranean climate with hot, dry summers and humid and cool winters. The average annual temperature range is 18.4 °C, and the rainfall is around 547 mm per year (<https://en.climate-data.org/africa/tunisia/bizerte/bizerte-3551/>; accessed on 31 May 2023).

### 2.2. Isolation and Culture Conditions

*Trichoderma* strains were isolated from rhizospheric soil of healthy plants of the wheat variety Florence Aurore cultivated in an organic farming system in Tunisia. Rhizospheric soil samples were randomly collected at grain-filling stage, i.e., Growth Stage 87, according to the code defined by Zadoks et al. [39]. One gram of soil tightly adhering to the roots was incubated in 10 mL of sterile Deshydrate Bouillon Potato Dextrose (Potato Dextrose Broth, PDB) in a test tube and shaken at 200 rpm for 30 min at 28 ± 2 °C. From this starting solution, serial dilutions were prepared at the following concentrations, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> and 10<sup>-3</sup>, and then plated on *Trichoderma*-Selective Medium (TSM) [40]. After 5 days of

incubation, all of the new colonies that appeared were purified and maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) at 25 °C. Pure cultures were cut into cubes using sterile scalpels, transferred into Eppendorf tubes containing 1 mL of 20% glycerol then stored at −20 °C for later use.

### 2.3. Molecular Identification and Bioinformatic Analyses of *Trichoderma* spp.

Molecular identification of *Trichoderma* strains was performed from monospore cultures. Fresh mycelia were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder with 2 mm diameter metal balls for 90 s. Genomic DNA was extracted using the Cetyltrimethylammonium Bromide method [41]. DNA concentration and purity were determined using a NanoDrop™ Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop, Saint Cyr l'Ecole, France). The three loci, which include the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS: ITS1-5.8S-ITS4), the partial translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) and the partial second-largest subunit of RNA polymerase II (*rpb2*), were amplified by polymerase chain reaction (PCR). PCR amplifications were carried out using BioRad thermal cyclers, and conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles including denaturation at 95 °C for 30 s, annealing for 30 s with the corresponding temperatures (58 °C for ITS, 56 °C for *tef1*, 55 °C for *rpb2*); extension at 72 °C for 45 s, then a final extension at 72 °C for 5 min. PCR reactions were performed in a final volume of 50 µL, comprising 1 µL genomic DNA (25 ng/µL), 10 µL colorless GoTaq Flexi Buffer (5×), 3 µL MgCl<sub>2</sub> solution (25 mM), 1 µL PCR Nucleotide Mix (10 mM each dNTP), 1 µL of each 5 µM primer, 0.25 µL GoTaq (G2 Flexi DNA Polymerase 5 u/µL) and 32.75 µL sterile water. The ITS primer pair consisted of *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) [42], the *tef1* primer pair consisted of EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') [43] and TEF1-LLerev (5'-GCCATCCTTGGAGATACCAGC-3') [44] and the *rpb2* pair consisted of RPB2-5F2 (5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') and RPB2-7CR (5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCA-3') [45]. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1.5%) and sequenced by the genomics service company Genewiz. Nucleic sequences were identified using NCBI BLASTn. The newly generated partial ITS, *tef1* and *rpb2* gene sequences of the six *Trichoderma* isolates reported in this study were recorded to NCBI GenBank database. Their accession numbers and those of the related *Trichoderma* strains used in the analyses are listed in Table 1.

**Table 1.** Species details and their GenBank accession numbers used in phylogenetic analyses.

Species	Strain/Isolate	ITS	<i>tef1</i>	<i>rpb2</i>
<i>T. afroharzianum</i>	Tahz01 <sup>a</sup>	OP970986	OR039793	OR039787
<i>T. afroharzianum</i>	Tahz02 <sup>a</sup>	OP970987	OR039794	OR039788
<i>T. afroharzianum</i>	Tahz01 <sup>a</sup>	OP970990	OR039795	OR039789
<i>T. atrobrunneum</i>	Tatr03 <sup>a</sup>	OP970988	OR039796	OR039790
<i>T. lentinulae</i>	Tlen01 <sup>a</sup>	OP970991	OR039797	OR039791
<i>T. lixii</i>	Tlix01 <sup>a</sup>	OP970989	OR039798	OR039792
<i>T. afroharzianum</i>	Tafum1	MT102401.1	MT081431.1	MT118246.1
<i>T. afroharzianum</i>	Tri-1	MT793748.1	OP102131.1	OP102132.1
<i>T. atrobrunneum</i>	T39	MG952890.1	KX632628.1	KX632571.1
<i>T. lentinulae</i>	CGMCC 3.19699	MN594478.1	MN605887.1	MN605876.1
<i>T. lentinulae</i>	CGMCC 3.19847	MN594469.1	MN605878.1	MN605867.1
<i>T. lixii</i>	C.P.K. 1934	EF392746.2	FJ179573.1	MT587315.1
<i>T. lixii</i>	TLiC8	MT434003.1	MT587276.1.1	MT587315.1
<i>T. reesei</i>	CBS999.97	CP020878.1	CP020876.1	CP017984.1
<i>T. atroviride</i>	TRS18	KJ786757.1	KJ786839.1	KP009061.1
<i>T. longibrachiatum</i>	Tloum3	MT102396.1	MT081437.1	MT118251.1

<sup>a</sup> The newly generated sequences and their respective codes used in this work.

The phylogenetic analyses were conducted on the concatenated gene version 5'-ITS (575 bp)/tef1 (1260 bp)/rpb2 (930 bp)-3', with the reference sequences downloaded from GenBank that correspond to the most related sequences. All of the nucleotide data were weighted equally, and gaps were treated as missing characters. After removing any ambiguously aligned regions, the alignments were 2639 nucleotides. The multiple DNA sequence alignments were performed with the Clustal-W algorithm. The maximum likelihood analysis was employed to construct a phylogenetic tree as implemented in the PhyML program. The topology of the tree was evaluated by bootstrap analysis of the sequence data based on 1000 random resamplings.

#### 2.4. Bioassays for Antagonism Traits of *Trichoderma* spp. against *F. culmorum*

##### 2.4.1. Plant Pathogen

Virulent isolate of *F. culmorum*, the causal agent of Fusarium seedling blight (FSB), was kindly provided by the crop laboratory (LGC) of the National Tunisian Institute of Agronomic Research (INRAT). Fungus was routinely grown and maintained on PDA medium at 25 °C.

##### 2.4.2. In Vitro Confrontation Assay

The antagonism of *Trichoderma* strains against *F. culmorum* was evaluated with dual culture assays, according to Skidmore and Dickinson [46]. Mycelial plugs of 5 mm diameter of *F. Culmorum* and *Trichoderma* strains (7-day-old) were placed on opposite sides of PDA Petri plate (8.5 cm diameter, containing 20 mL of PDA medium) at 5 cm from each other and at equal distance from the periphery. Co-cultures were incubated at 28 °C for six days. The radial growth of the *F. culmorum* in the presence of *Trichoderma* strains was measured, and the inhibition rate (IR) was calculated as follows:  $IR = R1 - R2 / R1 * 100$ , where R1 is the colony radius of *F. culmorum* in the control plate, and R2 is the colony radius of *F. culmorum* in the presence of *Trichoderma* strain. Each biological condition was repeated five times.

##### 2.4.3. Determination of Diffusible and Volatile Metabolite Productions

The activity of *Trichoderma* diffusible compounds was tested using cellophane method described by Dennis and Webster [47]. Strains were grown on Petri dishes containing a sterile cellophane sheet over the PDA medium. After five days of incubation at 28 °C, cellophane was removed, and a 5 mm plug of *F. culmorum* was placed in the center of each Petri plate. *F. culmorum* grown on untreated PDA served as control. Assays were carried out 5 times, and plates were incubated at 28 °C for five days. Results were expressed as the inhibition rate (IR) calculated according to the formula mentioned above, where R1 is the colony radius of *F. culmorum* in the control plates, and R2 is the colony radius of *F. culmorum* in the treated plates. To verify the volatile metabolite production, a qualitative method was used. Before inoculation, a 1.5 cm wide agar strip was removed from the mid-portion of PDA medium. A 5 mm diameter disk of *Trichoderma* strain was placed on one side, while a disk of *F. culmorum* was placed on the opposite side. PDA plates inoculated only with *F. culmorum* served as controls. All plates were sealed with parafilm, and this assay includes 5 replicates per biological condition. After seven days of incubation at 28 °C, the RI was determined according to the abovementioned formula.

##### 2.4.4. Qualitative Determination of Detoxifying and Lytic Enzyme Production

Qualitative determination of extracellular enzymes was performed on 7-day-old *Trichoderma* cultures. All assays were carried out in triplicate, and a non-inoculated plate was used for each biochemical test as negative control.

**Catalase.** Catalase activity was assessed with 3% v/v hydrogen peroxide. A 5 mm diameter plug of actively growing *Trichoderma* culture was put on a glass slide in a Petri plate, on which a drop of hydrogen peroxide was applied. The appearance of immediate bubbling reveals the positive catalase ability of the strain.

**Protease.** For protease enzyme detection, *Trichoderma* strains were grown on Glucose–Yeast–Peptone medium (GYP) with the following composition (per liter of distilled water): glucose, 1 g; yeast extract, 0.1 g; peptone, 0.5 g; agar, 15 g, supplemented with 1% Skim milk (pH 6.5) [48]. After seven days of incubation at 28 °C, a positive result for protease production was revealed by the appearance of a clear zone around the *Trichoderma* colony.

**Amylase.** To evaluate the amylase activity, *Trichoderma* strains were inoculated following the previous conditions on GYP medium enriched with 1% soluble starch as substrate for amylase enzyme [49]. After seven days of incubation, plates were flooded with an aqueous solution of Iodine 1% (*w/v*) in potassium iodide 2% (*w/v*) for 10 min, and then, the iodine solution was carefully removed by decanting each plate. Amylase activity was revealed by the presence of a clear halo around *Trichoderma* colony.

**Chitinase.** Chitinase assay was performed by growing *Trichoderma* strains on a basal medium comprising (per liter of distilled water): colloidal chitin, 1.5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.7 g; NaCl, 0.5 g; KCL, 0.5 g; yeast extract, 0.13 g, agar 15 g, and pH 5.5 [50]. After seven days of incubation, according to the previously cited conditions, plates showing a transparent halo around the colony were considered as Chitinase positive. The method of Roberts and Selitrennikoff [51] was used for colloidal chitin preparation. Five grams of chitin powder was added to 60 mL concentrated HCl and kept at 4 °C overnight with vigorous stirring. The mix was added to 500 mL of ice-cold 95% ethanol with rapid stirring and left overnight at room temperature. The precipitate was collected by centrifugation at 5000 × *g* for 20 min at 4 °C, washed with sterile distilled water several times until the colloidal chitin became neutral (pH 7.0) and stored in the dark at 4 °C before being used.

**Endoglucanase.** Czapek-agar medium was used to reveal cellulose degradation [52]. It is composed of (per liter of distilled water) NaNO<sub>3</sub>, 2 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g; KCl, 0.5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g; agar, 20 g, and supplemented with 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) as the sole carbon source (pH 4.5 adjusted with 100% glacial acetic acid). Petri dishes were inoculated with plugs of the different *Trichoderma* strains and incubated at the same cited conditions. After seven days, plates were flooded with an aqueous solution of Congo red (0.1% *w/v*). After five minutes of reaction, this solution was gently removed, and dishes were washed with 5 M NaCl to reveal the degradation halo.

## 2.5. Bioassays for Plant Growth Promoting Traits

### 2.5.1. Solubilization of Inorganic Phosphate

The capacity to solubilize phosphate was tested on solid Pikosvskaya medium (PVK) [53] that had the following composition (per liter): 10 g of glucose, 0.5 g of yeast extract, 0.5 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 g of MgSO<sub>4</sub>, 0.2 g of KCL, 15 g of agar and 5 g of Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> as sole source of phosphate. Plates were inoculated with a plug of 5 mm of *Trichoderma* (7 days old) with 3 repetitions for each strain per plate. After incubation for 7 days at 28 °C, the presence of a clear halo around the colony indicates the presence of phosphate dissolving activity. The experiment was conducted twice, with three sets of replication plates.

### 2.5.2. Colorimetric Detection of Indole-Related Compounds

Indole-related compound production was determined using a colorimetric method [54]. Two plugs of 5 mm of each *Trichoderma* strain (7 days old) were transferred in 10 mL of Potato Dextrose Broth (PDB) supplemented with 0.1% L-Tryptophan and then incubated under shaking at 28 °C for 72 h. Supernatant was collected from 1 mL of culture after 5 min of centrifugation at 14,000 rpm, then 100 µL of this supernatant was added to 200 µL of Salkowski reagent in triplicate. After incubation at room temperature for 30 min, the optical density was recorded at 530 nm [55]. The amount of indole-related compounds was calculated from a standard curve generated by suspending IAA in 100% ethanol at a concentration of 1 mg/mL and then diluted in PDB medium to a concentration of 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 and 10 µg/mL. PDB with or without L-Tryptophan served as controls. The experiment was conducted with three biological replicates.

### 2.5.3. Hydrogen Cyanide (HCN) Production

*Trichoderma* spp. was grown on solidified PDA supplemented with 4.4 g/L of Glycine or Succinate. White filter paper discs cut into the same size as the upper lid of the Petri dish were immersed in an alkaline Picric acid solution (Picric acid, 0.5% (v/v), Sodium carbonate, 1.25% (w/v); in water), and carefully positioned on the lid of each plate. Plates were sealed with Parafilm and incubated for seven days at  $28 \pm 2$  °C. After incubation, HCN production was observed by the color changes of the filter paper from yellow to light brown or reddish brown, which indicated the production of HCN [56]. Because HCN can be produced at very low concentrations, the filter paper was then immersed in 5 mL of distilled water to dissolve the precipitate, and the optimum density was measured at 625 nm using a spectrophotometer [57]. Each measurement corresponds to the mean of five biological replications.

### 2.5.4. Ammonia Production

Ammonia production was determined using a colorimetric method [58]. Each *Trichoderma* strain was tested for the production of ammonia in peptone water. Two plugs of 5 mm of actively growing *Trichoderma* (7 days old) were added to 10 mL peptone water and then incubated under shaking at 28 °C for 7 days. Cultures were centrifuged at 3500 rpm for 10 min. A volume of 50 µL of Nessler's reagent (7% KI; 10% HgCl<sub>2</sub>; 50% aqueous solution of NaOH (32%)) was added to 1 mL of every culture supernatant. Development of yellow to brown color indicates the presence of ammonia. The optical density was measured at 450 nm, and ammonia production was calculated using a standard curve of ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) solution at different concentrations of 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4 µmol/mL. Each measurement corresponds to the mean of three biological replications.

## 2.6. Bioassay of *Trichoderma* Strains for Plant Growth Promoting and *Fusarium* Seedling Blight Disease Suppression

The plant growth-promoting effect, as well as the suppression of *Fusarium* seedling blight (FSB) disease of 6 isolated *Trichoderma* strains on durum wheat, was tested by germinating the seeds in axenic conditions and then by monitoring their growth under greenhouse conditions for 3 weeks. The variety "Khlar", which is one of the most used and productive durum wheat varieties in Tunisia, has been chosen for this study [59]. Seeds were provided by the National Institute of Agronomic Research of Tunisia (INRAT).

### 2.6.1. Effect on Seed Germination in Axenic Conditions

Seeds were surface sterilized as described by Fernandez and Chen (2005) [60] with minor modifications. Seeds were soaked in an aqueous solution of 0.5% sodium hypochlorite (NaClO) for 5 min, washed three times with sterile distilled water, dried overnight on filter paper under aseptic conditions and placed in sterile dishes for further use. For fungal preparation, *Trichoderma* strains were grown on PDA medium under 12 h regime of fluorescent light at  $26 \pm 2$  °C for 7 days to promote sporulation. Fungal spore suspension of *F. culmorum* was prepared from a 2-week-old culture. The collected fungal suspension was filtered, macrospores were counted, and the concentration was adjusted to 10<sup>7</sup> spores/mL in sterile PDB.

Seeds were soaked for 24 h under slow shaking in 20 mL of *Trichoderma*-PDB suspensions (10<sup>7</sup> spores/mL) to promote *Trichoderma* growth on seeds (50 seeds in a falcon tube of 50 mL for each repetition). Seeds soaked only in PDB served as control, and each treatment was repeated 4 times. Seeds were dried on filter paper under aseptic conditions and then sown in square Petri dishes of 12 \* 12 cm (50 seeds per plate) containing 1% of water agar medium (10 g/L) previously autoclaved and sterilized for 30 min under UV radiations [61]. For *Fusarium* seedling blight suppression, seeds were prepared in a similar way, coated with *Trichoderma* strains and then sprayed with 1 mL of *F. culmorum* spore suspension adjusted at 10<sup>7</sup> spores/mL. Seeds sprayed only with *F. culmorum* served as positive control. All the following treatments, i.e., for non-treated seeds, seeds treated only with *Trichoderma*,

seeds treated with *Trichoderma* and *F. culmorum* and seeds treated only with *F. culmorum*, were repeated 4 times. All plates were sealed with parafilm and incubated in the dark at 25 °C for 5 days, and some parameters, which include the final germination percentage (FGP), fresh weight of seedlings and root and shoot lengths, were measured. FGP was calculated using the following formula:  $FGP = \text{germinated seeds} / \text{total seeds} * 100$ .

#### 2.6.2. Effect on Seedling Growth under Greenhouse Conditions

After 7 days of germination in axenic conditions, PDB control and fungal-treated seedlings (treatments described in the Section 2.5.1) were carefully removed from water agar medium and transferred into pots of 6 \* 6 \* 6 cm, with 1 seedling per pot. Each experiment incorporates six biological repetitions. Substrate consisted of 1/3 sterilized sand and 2/3 potting soil. All pots were placed in greenhouse under the following conditions: 16/8 h light/dark photoperiod under an illumination of 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  photosynthetic photon flux density, a temperature of  $23 \pm 0.5$  °C, and a relative humidity of  $65 \pm 5\%$ . Pots were watered every two days with tap water for 21 days until all plants were harvested to complete all the ecophysiological measurements (fresh and dry weights, shoot and root lengths, cf Section 2.5.3) and molecular analyses (cf Section 2.7).

#### 2.6.3. Measurements of Total Chlorophyll, Epidermal Flavonols, Nitrogen Balance Index (NBI)

Chlorophyll content (Chl), epidermal flavonols (Flav) and NBI were measured in vivo using Dualex sensor (Force-A, France), which is a clamp that performs instantaneous and non-destructive quantifications [62]. All proxy measurements were done on uniform, fully developed and light-exposed leaves of the same plant 21 days after fungal treatment.

#### 2.6.4. Total RNA Isolation, cDNA Synthesis, and Quantification of the Defense-Encoding Gene Accumulation

From the experimental set-up used for the ecophysiological analyses and concomitantly to the execution of the ecophysiological measurements, the aerial and root tissues were collected from fifteen randomly selected plants, which were then distributed into 3 biological replicates, each comprising the tissues of 5 plants. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C before being used. Samples were ground to a fine powder with 3 metallic balls for 90 s ( $\varnothing$  5 mm) in Eppendorf tubes. Total RNA was extracted using a CTAB extraction buffer (Cetyltrimethylammonium Bromide), including the elimination of the genomic DNA as previously described in Ben Amira et al. (2018) [63]. The quality and quantity of the recovered total RNA were estimated by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Two  $\mu\text{g}$  of total RNA were reverse-transcribed with Oligo-dT using the SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantification of the transcript levels of genes was measured by real-time quantitative PCR from 1  $\mu\text{L}$  of cDNA diluted 30-fold with sterile water. Expression analysis of the targeted genes involved in the defense responses (listed in Table S1 in Supplementary Materials) was performed with an Applied Biosystems StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Takyon<sup>™</sup> Rox SYBR<sup>®</sup> MasteMix dTTP Blue (Eurogentec, Liege Science Park, Belgium), according to manufacturer's recommendations. PCR cycling conditions were 1 cycle for 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles for 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C, and 10 s at 72 °C. PCR reactions were ended by generating a dissociation curve of 60–95 °C with an increment of 0.3 °C/15 s to ensure primer dimers and nonspecific amplifications. Three reference genes (*Actin* (ACT), *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (RPN), and *RNaseL inhibitor-like* (RLI)) were used to normalize the expression results of the target genes. The reference genes were chosen from a panel of widely used reference genes and specifically selected for their stable expressions between samples and treatments. Moreover, each referer belongs to protein families involved in different cellular processes in order to minimize the risk of co-regulations. The expression level of the normalized target genes in each RNA preparation was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  [64]. All reactions were performed in triplicate.

Primer pairs are detailed in Table S1 in Supplementary Materials. PCR efficiencies ( $E$ ) and conditions were determined by comparing threshold values in a dilution series of the RT product ( $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ ,  $\times 80$ ), followed by non-template control for each primer pair. PCR efficiencies are given in Table S1 in Supplementary Materials.

#### 2.6.5. PCR Detection of *Trichoderma* and *F. culmorum* Strains in Wheat Roots and Leaves

The presence of *Trichoderma* or *F. culmorum* isolates was qualitatively characterized in the cDNA samples used for gene expression defense analysis. Amplifications targeted the *tubulin*-encoding gene with primer pairs specific to each fungal genus (*Trichoderma*: 5'-GTACTAAGTTGTTTCTTTGCTGTTG/5'-CTCTGTACATACACCAATTGCTC; *Fusarium*: 5'-GAGTACTAAGCGGTTTCGGATGC/5'-GCATGCCGCGTGCGCGCAAGGTTTC; (5'-Forward/5'-Reverse)) [63]. The PCRs were carried out on cDNAs diluted by 1:5 and 1:20, according to the PCR cycling conditions described above, and with a hybridization temperature fixed at 68 °C.

#### 2.7. PCR Statistical Analysis

Ecophysiological response variables were collected from at least three biological replicates. The standard one-way Analysis of Variance (ANOVA) was carried out to test the effect of Strain factor on each of these variables. Homogeneity of variance between strains was examined using Levene's test [65] using the `car::leveneTest` function [66], and normality was examined through visual inspection of the residuals as well as the Shapiro–Wilk test [67] using the `stats::shapiro.test` function using R Statistical Software (v4.2.2; R) [68]. If the homogeneity of variance assumption was violated, Welch One-Way ANOVA [69] was carried out using the `stats::oneway.test` function. Multiple comparisons of means were carried out using Tukey's HSD post hoc test, with the "`rstatix::tukey_hsd()`" for standard ANOVA or the Games-Howell test [70] with the "`rstatix::games_howell_test()`" for Welch ANOVA [71]. Omega squared was used as a measure of the effect size for standard ANOVA and as estimation for Welch ANOVA [72]. It is an estimate of how much variance in the response variables is explained by the Strain factor. For omega squared, 0.01 to <0.06 indicates a small effect size, 0.06 to <0.14 is a medium effect size, and  $\geq 0.14$  is considered a large effect size [73]. It was computed with `MOTE::omega.F` function [74]. The Kruskal–Wallis test [75] based on ranks of data was computed with `stats::kruskal.test` function and used instead of a one-way ANOVA in case the normality assumption did not hold. The rank epsilon squared was then computed with `rcompanion::epsilonSquared` and utilized as a measure of the Kruskal–Wallis test effect size [76]. It varied between 0 and 1 and indicated the ratio of variance in the response variable explained by the explanatory variable, the Strain factor. It also indicated the degree to which one strain had data with higher ranks than the other strain. For rank epsilon-squared, 0.01 to <0.08 indicates a small effect size, 0.08 to <0.26 is a medium effect size and  $\geq 0.26$  is considered a large effect size [77]. Kruskal–Wallis test was followed by Dunn's *post hoc* test [78] using `agricolae::kruskal` [79] for multiple comparisons of medians. All statistical analyses were performed using R Statistical Software (v4.2.2; R) [68].

Concerning the molecular analyses, statistical analyses were performed with R (v4.2.3; R) [68]. Gene expressions obtained with DCT data were normalized using `BestNormalize` (1.8.3) package. Normality was tested with Shapiro–Wilk's W test [80]. Homoskedascity was tested with Bartlett's test [81]. Significant differences were called using Student's *t*-test implemented with `ggpubr` (version 0.6.0) [82] and `tidyverse` (version 2.0.0) [83] packages. Differential gene expressions were selected after false discovery rate control using Benjamini–Hochberg procedure [84] and filtered at 5% error level.

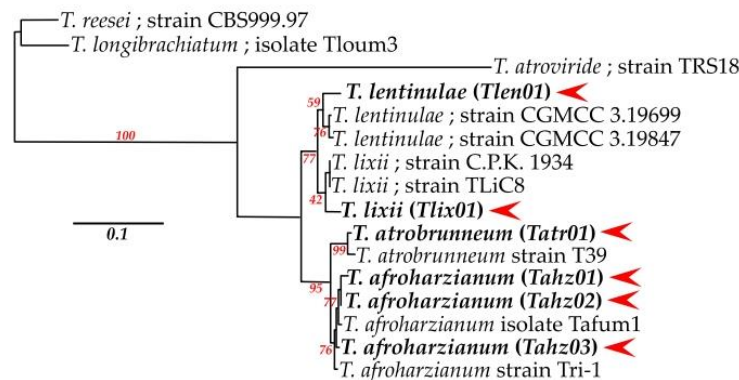
### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Phylogenetic Position of the *Trichoderma* Isolates

A total of 111 strains were isolated on TSM medium from rhizospheric soil samples. In order to identify the potential strains from the diversity of colonies, a fragment of



approximately 575 bp of the *ITS* region was obtained from PCR amplification using ITS1 and ITS4 primers, followed by forward and reverse sequencing. The BLASTn alignment on the NCBI database enabled us to retrieve six different sequences that share about 98% to 100% similarity with *Trichoderma* strains. These sequences were divided into three large groups with highly significant bootstrap values (NJ (Neighbor-Joining) method) (Figure 1): a first group of 66.66% from the total isolates represented by three different *Trichoderma harzianum* strains, a second group of 14.41% represented by one *Trichoderma lixii* and a third group of 18.91% represented by two *Trichoderma* sp. close to the *T. harzianum* complex. Every sequence was recorded in NCBI, and the related GenBank accession numbers are given in Figure 1.



**Figure 1.** ITS-*tef1-rpb2* based molecular phylogenetic analysis of the six *Trichoderma* spp. isolates (red triangle) with closed sequences retrieved from NCBI. The analysis was generated using the maximum likelihood analysis implemented in the PhyML program. Values of the bootstrap analysis (1000 repetitions) are given at the nodes. Bar 0.1 corresponds to the nucleotide substitution per sequence position. Each new strain is labeled with an acronym (e.g., *Tahz01*, *Tahz02*, etc.) that will be used throughout the article.

Interestingly, all six isolates were placed in the *T. harzianum* complex [36–38]. Since ITS loci analyses are insufficient to distinguish the species' delimitation within a closely related *Trichoderma* species complex such as *T. Harzianum* [85–87], partial regions of loci encoding *tef1* and *rpb2* were sequenced from these six “*T. harzianum*” isolates. These loci are powerful sources of information due to their inherent interspecific variations and are extensively used to accurately resolve the taxonomy of *Trichoderma* [88,89]. The analysis of concatenated ITS-*tef1-rpb2* sequences confirmed that the six isolates belong to a common complex. Moreover, it facilitated the identification of the two *Trichoderma* sp. isolates, as being the *T. afroharzianum* (*Tahz03*) and *T. lentinulae* (*Tlen01*) species. Similarly, the species' range was substantially clarified for the three *T. harzianum*, which are precisely affiliated with two *T. afroharzianum* (*Tahz01* and *Tahz02*) and one *T. atrobrunneum* (*Tatr01*). *T. atrobrunneum* is a new species clade closely related to the *T. Afroharzianum* taxon but clearly distinguished within the *T. harzianum* sub-complex [90]. Finally, this multi-loci analysis confirmed the correct identification of *T. lixii* (*Tlix01*), which is phylogenetically close to *T. lentinulae* and forms a highly supported clade with it. These two clades, *T. afroharzianum*/*T. atrobrunneum* and *T. lixii*/*T. lentinulae*, have been separated from the *T. harzianum* complex [38,91].

Each strain exhibited the expected morphological characteristics (macro- and microscopic) of the *Trichoderma* genus (Figure S2 in Supplementary Materials). On the Potato Dextrose Agar (PDA) medium, *Trichoderma* strains appeared as fast-growing colonies, concentric halos and floccose or compact surfaces that looked similar to tufts. The mycelium started out white, then turned green due to the production of conidia. Under an optical microscope, abundant sporulation of conidia with smooth or rough appearance was observed,

conidiophores were branched and irregularly verticillated, and phialides were generally ampliform or fusiform and arranged in clusters, according to Gam et al. [92].

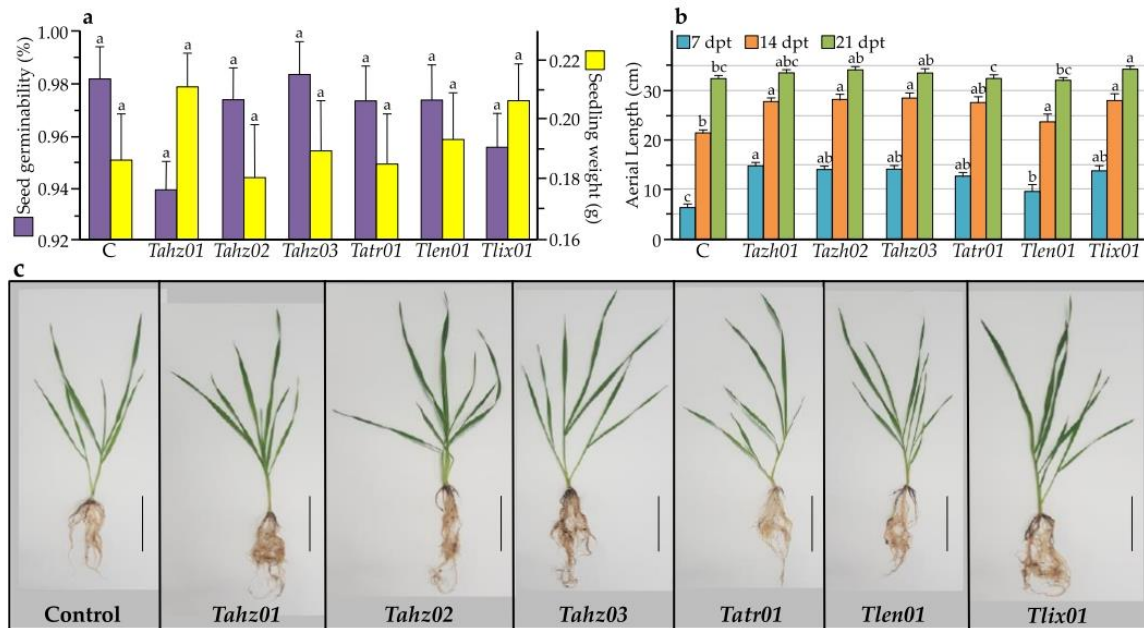
All of these species have also been reported all across the world; however, to our knowledge, this is the first report of *T. atrobrunneum*, *T. lixii* and *T. lentinulae* in an agroecological context in Tunisia, and they have never been introduced as beneficial agents in wheat.

Some *Trichoderma* strains were isolated from Tunisian soil and plant habitats. Their characterization was based on evaluating their occurrence and diversity within contrasting bioclimatic zones [93,94] or on their PGP and/or BCA abilities on perennial (*T. harzianum* on Olive trees [32]) or annual crops (e.g., *T. harzianum* and *T. viride* on Potatoes [95] and Faba bean [96]; and *Trichoderma* spp. on wheat [33,34]). The strains mentioned in these studies represented different ranges of *Trichoderma* complexes, and these strains and some of our isolates presented common strain complexes, of which *T. (afro)harzianum* appeared to be the most representative. However, little is known about the diversity of *Trichoderma* spp. that occurs or interacts with wheat, with most studies focusing on *T. harzianum* and more marginally on *T. gamsii*, *T. viride*, *T. koningii* or sp. [16,33,35,97,98]. *T. harzianum* T22, originally derived from the fusion of two auxotrophic strains, T-95 and T-12, and the first fungus registered by the Environmental Protection Agency (EPA) for biocontrol of plant diseases in 1989 [99], is still one of the most widely used biopesticides today [16,100,101]. The genus *Trichoderma* has more than 150,000 members, and of the hundreds of *Trichoderma* sp. species recorded, only a fraction is exploited as biocontrol agents on field crops. The diversity of the above-mentioned Tunisian strains added to our own (with the originality of the *T. atrobrunneum*, *T. lixii* and *T. lentinulae*) and remained, nevertheless, a very promising source of beneficial agents. To this end, the study of this fungal genus is still a very active research area, especially as the beneficial influences of these fungi are dependent on the fungal strains and the plant species with which they interact. Likewise, this situation is paradoxically prevalent in durum wheat, especially during FSB on durum wheat caused by *F. culmorum*. Because the plant growth-promoting potential varies between different *Trichoderma* species and strains, and also because local isolates are now favored over *Trichoderma*'s subsequent use as biofertilizer and biocontrol agents, we have evaluated the plant growth-promoting abilities and the antagonism activities of these six native *Trichoderma* strains isolated from wheat rhizosphere against that of *F. culmorum* in vitro and in vivo.

### 3.2. *Trichoderma* Isolates Exhibit Differential PGP Abilities

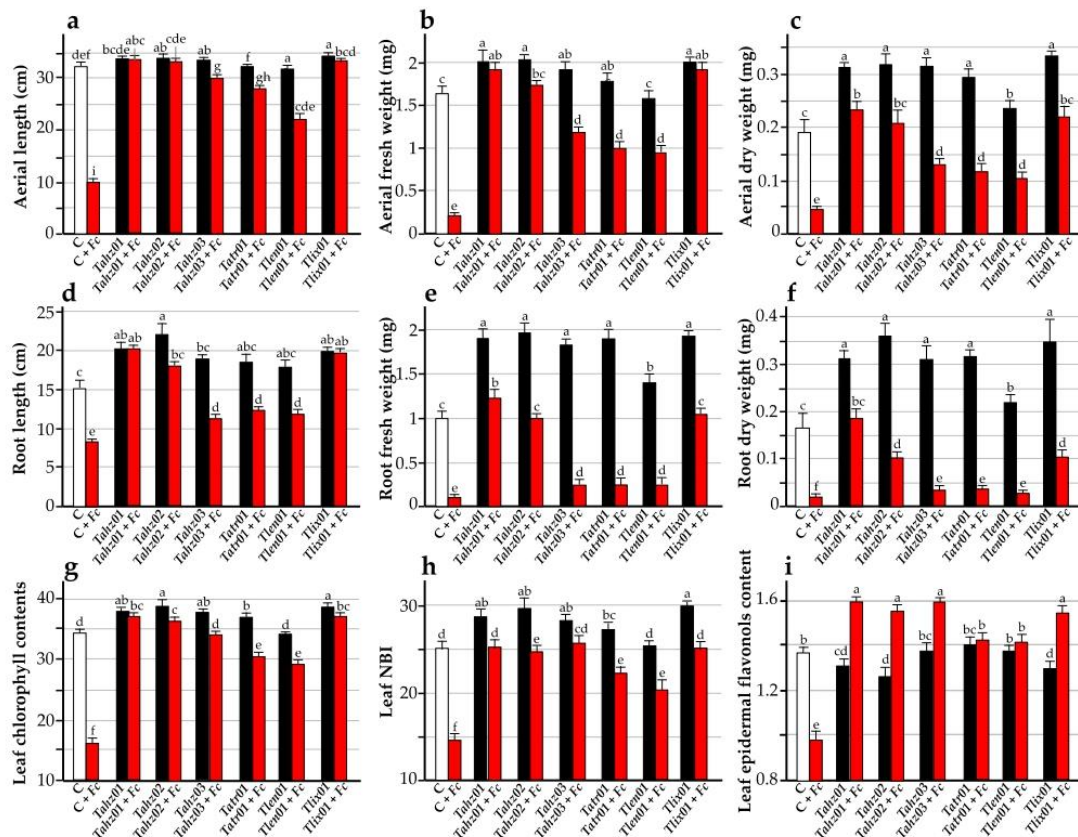
During germination in axenic condition, coating seeds with all six *Trichoderma* strains showed no significant effect on the final germination percentage effect ( $p$ -value for Kruskal–Wallis rank sum test = 0.4971; rank epsilon2 = 0.199) or on total fresh weight of 7-day-old seedlings ( $p$ -value for standard ANOVA = 0.246; omega squared = 0.029) (Figure 2a).

In addition, no particular symptom related to any pathogenicity expression of our tested *Trichoderma* strains was observed on the variety of wheat Khlar used in this study, whether during germination or seedling growth experiments (Figure 2c; Figures S3 and S4 in Supplementary Materials). These first symptomatological inspections are of the utmost significance and should be performed on all wheat genotypes commonly grown in Tunisia. Indeed, some studies have shown that the treatment with *Trichoderma* either had no effect or was even detrimental. In this respect, several *Trichoderma* species are included among pathogens of cultivated plants: e.g., *T. viride* is the causal agent of onion green mold rot [102], and *T. afroharzianum* is responsible for the occurrence of a new ear rot disease in maize in Europe [103].



**Figure 2.** Effect of *Trichoderma* strains on seed germination (seed germinability and seedling weight) at 7 days after fungal treatment and on wheat plant morphology (a) and leaf length (b) over time (i.e., 7, 14 and 21 days after treatment). (c) Morphological status of the plants at the end of the experiment (21 days after treatment). C, PDB control. Scale bars in photographs represent 10 cm. Data correspond to the mean of fifty (a) and twenty (b) plants, respectively. Bars represent the standard biological error. Distinct letters in the same column indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

Seven days after planting seedlings in pots, the plant growth-promoting ability was clear, and every isolate exhibited a significant ( $p$ -value for Welch's ANOVA =  $1.53 \times 10^{-7}$ ; estimated omega squared = 0.562) biostimulatory effect on shoot height (Figure 2b,c). This impact was still significant 14 days later ( $p$ -value for Welch's ANOVA =  $1.80 \times 10^{-9}$ ; estimated omega squared = 0.693) (except for *Tlen01*) and even up to 21 days later ( $p$ -value for standard ANOVA =  $1.75 \times 10^{-5}$ ; omega squared = 0.193) (except for *Tlen01* and *Tatr01*). The effect size for the shoot height after 7 days, as well as after 14 days and 21 days, was large; the observed differences among strains for the shoot height were of practical significance. At day 21 in the greenhouse, the lengths of shoots from seeds coated with *Trichoderma* strains were 4% to 11% longer, depending on the isolate, than those of untreated seeds. The best stimulatory effects on seedling growth were observed with the isolates *Tahz02* and *Tlix01* compared to the other tested strains. These effects were manifested by a highly significant ( $p$ -value for Kruskal–Wallis rank sum test < 0.0001) increase in both shoot (rank epsilon2 = 0.644) and root (rank epsilon2 = 0.535) length as well as fresh (shoot: rank epsilon2 = 0.591; root: rank epsilon2 = 0.621) and dry biomass (shoot: rank epsilon2 = 0.602; root: rank epsilon2 = 0.661) (Figure 3a–f). For all these variables, rank epsilon2 values showed a large effect size between strains; the magnitude of the differences in the mean scores among the strains seems to be large on these variables.



**Figure 3.** Effect of *Trichoderma* strains on physio-morphological parameters: (a) aerial length, (b) shoot fresh weight, (c) shoot dry weight, (d) root length, (e) root fresh weight, (f) root dry weight, (g) leaf chlorophyll content, (h) Leaf NBI, and (i) Leaf epidermal flavonols content of wheat plants (*Khlar* variety) after 21 days of cultivation in greenhouse conditions. White bars: control condition (C), which corresponds to healthy plants from seeds treated with sterile PDB (C); Black bars: plants from seeds inoculated with *Trichoderma* isolates; Red bars: plants inoculated with *F. culmorum* (Fc) or co-inoculated with *F. culmorum* and *Trichoderma* isolates. Data correspond to the mean of twenty plants. Bars represent the biological standard error. Distinct letters in the same column indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

Additional ecophysiological traits correlated with the nitrogen status, such as leaf chlorophyll content and nitrogen balance index (NBI), as well as the secondary compounds related to plant defenses with the epidermal flavonols, were measured using Dualex, a non-destructive method commonly used for assessing ecophysiological traits in many plant species, including wheat [104]. Chlorophylls are key compounds for the photosynthetic process, and a great deal of research revealed the direct relationship between the number of chlorophylls and photosynthetic rates. As for the NBI, it is defined as the ratio of chlorophylls to epidermal flavonols (Chl/Flav) [104]. This proxy is an informative indicator for crop growth as the high and low nitrogen status can be quickly monitored by measuring NBI, providing accurate information for farmers to make timely N management decisions. It is generally assumed that a high NBI is an indicator of both high nitrogen content and high nitrogen use efficiency [105]. Results showed a remarkable impact on total chlorophyll content when seed coating with *Trichoderma* strains ( $p$ -value for Kruskal–Wallis rank sum test  $< 0.0001$ ; rank epsilon2 = 0.411) (Figure 3g). All tested *Trichoderma* strains (except

for *Tlen01*) significantly enhanced leaf pigments as demonstrated by the measurement of chlorophyll content: *Trichoderma*-treated plants exhibited 107% to 112% higher chlorophyll content which was positively correlated with the nitrogen content [106]. The improvement in the photosynthetic capacity of plants, modulated by various endophytic *Trichoderma* spp., would be attributed to an increase in the number of photosynthetic pigments (in addition to the expression of genes regulating the biosynthesis of chlorophyll and proteins integrated into the light-harvesting complex or the Calvin cycle [107]). These cell responses would be elicited by specific secondary metabolites and/or VOCs emitted by the fungus [108,109]. All isolates secreted VOCs (phenomena described in Section 3.4.2), and it is plausible that these emissions are involved in the observed increase in photosynthetic pigment content and in the ensuing promotion of plant growth.

Similarly, NBI, as well as leaf flavonol content, were significantly influenced by the strains ( $p$ -value for Kruskal–Wallis rank sum test < 0.0001), and large effect sizes were detected (rank epsilon2 = 0.333 for NBI, and 0.369 for flavonol). NBI has significantly increased between 108% to 118% under the effect of all *Trichoderma* strains except for the strain *Tlen01*, which has almost the same NBI as the control plants (Figure 3h). In contrast, leaf flavonol content decreased significantly for *Tahz02* (−8%) and *Tlix01* (−5%) and showed a similar trend for *Tahz01* (−28%). *Tatr01* and *Tahz03* and *Tlen01* showed the same flavonol content as the control plants (Figure 3i). Flavonols (or flavonoids) are abundant and ubiquitous secondary compounds in plants. They are produced through the phenylpropanoid pathway, and their abundances can be regulated through de novo biosynthesis or rapid translocation and modification of existing compounds. Because of their remarkably versatile function, these molecules integrate many physiological processes, including plant growth (as well as disease resistance, which will be discussed in Section 3.4.1). In this respect, their accumulation is a rapid and long-lasting physiological response to PGP in general and *Trichoderma* spp. in particular [110–112]. In our study, the slight decrease in (only for *Tahz01*, *Tahz02* and *Tlix01*) or stable abundances of these flavonols for the other strains are not contradictory. Indeed, the chlorophyll content is positively correlated with the nitrogen content, while the content of epidermal flavonols is inversely correlated to nitrogen content [106]. Thus, the decreases in flavonoid accumulations observed with the strains exhibiting the strongest PGP potentials would reflect basal constitutive amounts of phenolic compounds in wheat leaves that can remain under the influences of external stimuli, a priori of root origin and induced under *Trichoderma* activity. In other words, these differential contents between strains would result from molecular and systemic signals, which would be strain dependent. In addition, our study is based on the duration of the interaction and not on short time intervals after the protagonists' interactions. In this respect, the abundances recorded 21 days after germination do not prejudice those that could have been recorded after a few hours or a few days of treatment. For example, a low level of flavonols correlated with a high NBI was also observed in maize seedlings from seeds inoculated with *T. atroviride* [106]. Similarly, we hypothesize here that the low flavonol abundances recorded for some strains echo the plant growth promotion induced by these same strains, knowing that under conditions of no stress, these two physiological processes interfere with each other. In any case, the content of epidermal flavonols recorded in wheat plants treated with the six *Trichoderma* isolates confirms that treatment with these strains did not affect the general health of the plants.

### 3.3. *Trichoderma* Isolates Exhibit Differential Biochemical Potentials

The isolated *Trichoderma* strains in this study developed significant and long-lasting PGP abilities four weeks after seed coating, and these abilities are strain-dependent. This finding strongly suggested that these strains produced growth-regulating factors or displayed metabolic activities that are involved in the increase of seedling growth kinetics. In this respect, the PGP potential of the six *Trichoderma* strains was assessed in vitro through the production of ammonia (NH<sub>3</sub>), Hydrogen cyanide (HCN) and indole-related compounds and their ability to solubilize phosphate (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) (Table 2).

**Table 2.** Plant growth-promoting traits of *Trichoderma* isolates after 5 days of fungal growth.

Strains	Phosphate Solubilization	Indole-like Compounds Production ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Ammonia Production ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	HCN Production
<i>Tahz01</i>	-	$4.16 \pm 1.76^b$	$16.7 \pm 1.2^a$	-
<i>Tahz02</i>	-	$12.43 \pm 6.56^a$	$15.9 \pm 0.3^a$	-
<i>Tahz03</i>	-	$0.93 \pm 1.35^d$	$14.4 \pm 1.4^a$	-
<i>Tatr01</i>	-	$1.7 \pm 0.2^c$	$14.1 \pm 1.5^a$	-
<i>Tlen01</i>	-	$1.1 \pm 1.81^{ed}$	$14.8 \pm 1.1^a$	-
<i>Tlix01</i>	-	-	$14.4 \pm 2.4^a$	-

Values are means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Distinct letters in the same assay indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ). A “-” corresponds to an absence of phosphate solubilization and HCN or indole-like compound productions.

In our study, only the ammonia and the indole-related derivatives tests were positive. All strains were able to produce ammonia at the same level, and a level in the range of  $14.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  to  $16.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ . *Tahz01* was found to produce the highest amount of ammonia. This result is supported by several studies showing the ability of *Trichoderma* to produce ammonia [61,113,114]. Ammonia is an essential trait linked to plant growth promotion, and the produced ammonia has been shown to supply nitrogen to the plant, thereby promoting root and shoot elongation and biomass [115]. Likewise, all strains produced indole-related derivatives, with the exception of *T. lixii* (*Tlix01*), for which no production was detected for the three technical repetitions. *T. afroharzianum* strains seem to be the most productive, in particular *Tahz02* with  $12.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and, to a lesser extent, *Tahz01* with  $4.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The other isolates showed lower production ranges (i.e.,  $0.93$  to  $1.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). These levels were commonly recorded for some *Trichoderma* spp. [116–118] or rhizospheric PGPs [119,120]. Several factors can be put forward to explain these variations in the production of indole-like derivatives between strains: for example, the differential modulation of the biosynthetic pathways and the related-regulatory pathways or the thermodynamic specificities of enzymes that convert primary heterocyclic aromatic organic compounds (Tryptophan) into several indoles and related conjugates forms [121]. A colorimetric method using Salkowski’s reagent was performed to quantify the production of indole-related compounds, but it does not allow the specific determination of Indole-3-acetic acid (IAA), even if the standard curves were carried out with pure IAA. Indeed, the levels of IAA produced in plant biological tissues or by microorganisms are infinitesimal to the order of nM [122]. However, *Trichoderma* spp. increased systemic biomass production and lateral root growth promotion in several plant species such as *Arabidopsis* [123], tomato [124] or cucumber [125], two physiological processes which are known to be dependent on IAA. We do not exclude that IAA is produced by our isolates, but this hypothesis must be validated by additional and more precise analytical methods such as High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) [126], Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric (LC-ESI-MS/MS) [127] or again by High-Performance Thin Layer Chromatography HPTLC [128]. It is nevertheless true that Salkowski’s reagent test is a useful primary index in the screening of PGP functional rhizospheric microorganisms correlated to the production of various indole-related compounds and derivatives—among which IAA is a key substance—such as *Trichoderma* genus.

It is suggested that over 80% of rhizosphere bacteria are capable of synthesizing IAA and/or indole-related derivatives. Correlated to these specific metabolic syntheses, these strains are identified as biostimulators of plant growth, particularly by stimulating lateral and adventitious root length [129]. An increase in root surface area allows plants to access more minerals and nutrients from the soil and, presumably, to absorb them better [130]. It is confusing but nevertheless very interesting that *T. lixii* is one of the best-performing PGP isolates while it does not seem to produce indole-like derivatives. Although *T. lixii* is usually presented as the sexual state of *T. harzianum* in nature, we demonstrate here that each strain is genetically distinctive, including in their ability to produce Indole-like

metabolites. To the best of our knowledge, no bibliographic reference reports the lack of production of indoles-like and/or IAA-related derivatives by *T. lixii* spp. Further analytical research (e.g., HPLC, LC, or HPTLC) would provide a definitive answer to this observation.

A contrario, all strains did not appear to metabolize phosphate nor produce HCN. Phosphate is essential for long-standing crop production, and although it is present in large amounts in soils, it needs to be mainly solubilized by the soil microbial community in order to be mobilized by plants [131] (Fankem et al., 2006). As for HCN, its production is intricately related to antifungal activity and the priming of the root length and root hair germination [132]. Each test was performed qualitatively on Pikovskaya's agar medium, which was supplemented with tri-calcium phosphate as an insoluble phosphate source, and by using Glycine or Succinate as primary substrates, respectively. The absence of these activities has been found in other studies applying the same methods [61,113,118], although some positive activities have also been demonstrated [133,134].

#### 3.4. *Trichoderma* Isolates Exhibit Functional BCA Abilities against *F. culmorum*

*Trichoderma* spp. uses several antagonistic strategies against plant diseases. This includes the expression of a direct aggressiveness against its prey (i.e., the phytopathogenic fungi) by using mycoparasitism, antibiosis and secretion of extracellular cell wall-degrading enzymes and by eliciting transcriptional expression of a large set of host resistance-related genes.

##### 3.4.1. *Trichoderma* Isolates Annihilate the Expression of Fusarium Seedling Blight Disease (FSB) Symptoms in Wheat

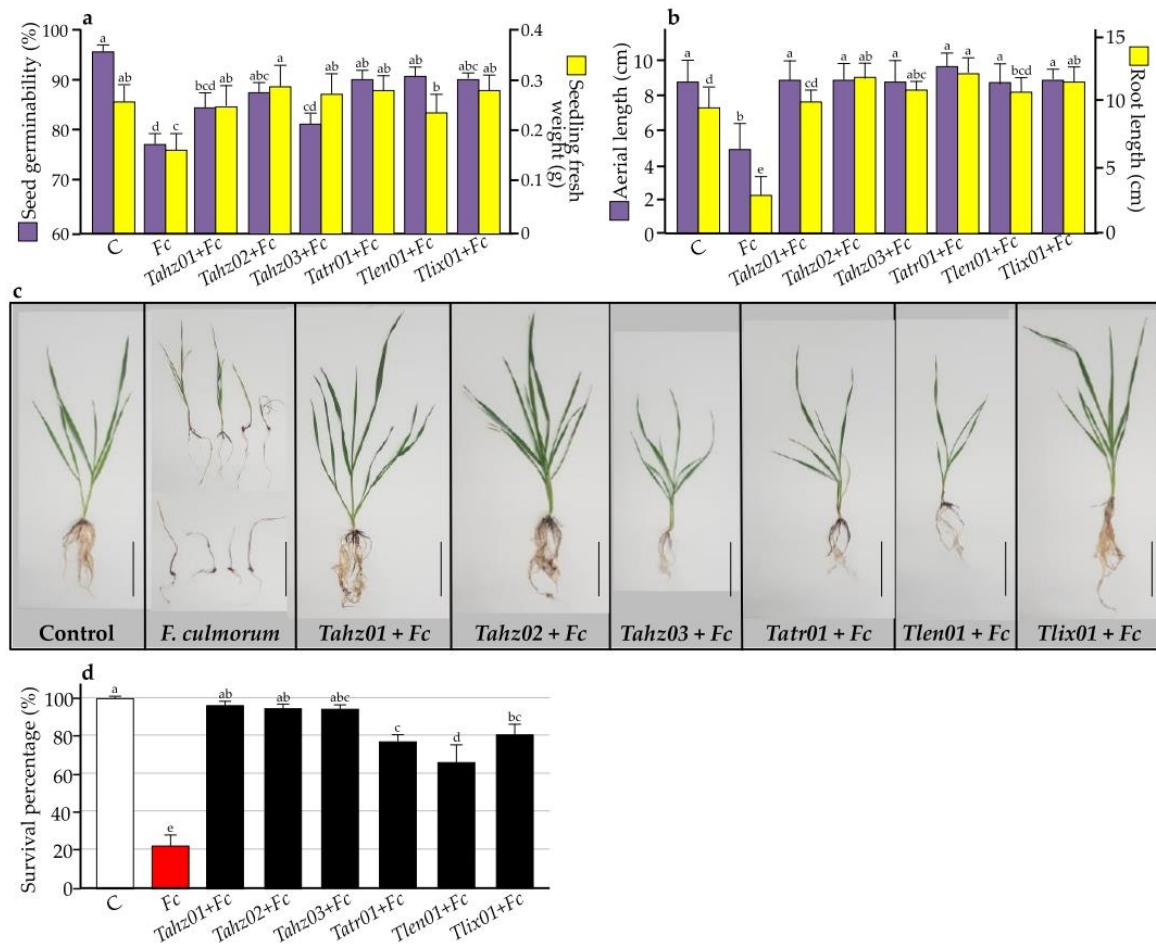
In order to confirm the bioprotective capacities of our isolates against Fusarium seedling blight (FSB) induced by *F. culmorum* in wheat, two bioassays were conducted, including a germination test in a water agar medium (in vitro), followed by a greenhouse seedling growth experiment for up to 3 weeks.

The first bioassay, based on seed emergence in vitro, showed highly pathogenic behavior of *F. culmorum*, with mycelium surrounding the seed by forming thick and robust hyphae (Figure S4 in Supplementary Materials). This infection blocked seed germination before the appearance of coleoptile and radicle, killing more than 23% of the seeds (Figure 4a). Therefore, the final germination percentage (FGP) was significantly impacted by *F. culmorum*; it ranged from 75% in seeds infested with *F. culmorum* compared to 97% in non-infested seeds (control) (Figure 4a). For seeds that managed to germinate, they were significantly impacted by the aggressiveness of *F. culmorum*, showing the lowest total fresh weight and reduced root and shoot lengths (Figure 4a,b; Figures S3 and S4 in Supplementary Materials).

Treatment with *Trichoderma* isolates showed that they were able to profoundly combat the negative impacts of *F. culmorum*, which is reflected in the suppression of the appearance and development of any *Fusarium* symptoms (Figures S3 and S4 in Supplementary Materials). This results in a significant increase in the final germination percentage for *Tahz02*, *Tatr01*, *Tlix01* and *Tlen01* to levels similar to that of the control and complete suppression of the negative effect of *F. culmorum* on total fresh seedling weight, shoot and root length for all strains. In addition, *Tahz02*, *Tahz03*, *Tatr01* and *Tlix01* showed a bioprotective and biostimulatory effect at the same time (in the presence of *F. culmorum*) by significantly increasing root length compared to the control (Figure 4b).

The second bioassay carried out in a greenhouse aimed to confirm the protective performance of *Trichoderma* isolates on growing wheat. Results showed that *F. culmorum* severely negatively affected the survival of seedlings (Figure 4d). Only 22% of seedlings had survived and showed reduced growth parameters (shoot/root lengths, fresh/dry total weights, leaf Chl/Flav content and NBI). We note, however, that the protective abilities of *Trichoderma* isolates were expressed differently between our six strains. The strain *Tahz01* had completely protected the seedlings from *F. culmorum*, with neither the survival percentage nor the growth parameters being significantly influenced by *F. culmorum* infection, allowing seedlings to grow normally. In this respect, *Tahz01* is considered to be the best

protective *Trichoderma* strain tested in this study. In addition to that, this strain (*Tahz01*) has exhibited a biostimulatory effect in addition to its protective role. This effect was made very clear from the values of the shoot/root lengths, total fresh weight, shoot dry weight and leaf chlorophyll contents, compared to the values of the control seedlings (Figures 3 and 4d). The rest of the strains were partially protective by reducing the aggressiveness of *F. culmorum*. *Tahz02* and *Tahz03* were the most efficient when it came to seedling survival, while *Tatr01*, *Tlen01* and *Tlix01* were less effective (Figure 4d). Concerning the growth parameters, the ecophysiological traits recorded in leaves (chlorophyll content and NBI proxy) were relatively unaffected, while a weak protective action was noted in roots (fresh and dry weights) for *Tahz03*, *Tatr01* and *Tlen01* (Figure 3).



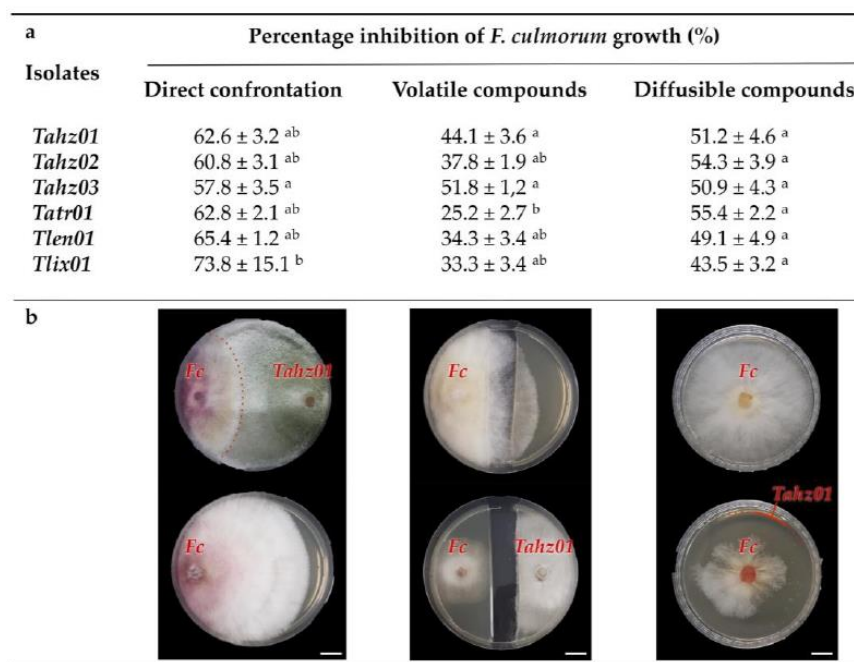
**Figure 4.** Bioprotection effect of *Trichoderma* strains on wheat plant infested by *F. culmorum* (Fc). (a) Percentage of germination and fresh seedling weight, and (b) aerial section and root lengths, 7 days post-germination in an axenic environment. (c) General morphological aspect of plant co-inoculated by antagonists, and (d) percentage of plant survival 21 days post germination. C, sterile PDB control. Scale bars in photographs represent 10 cm. (a,b) correspond to the mean of thirteen plants; (d) corresponds to the mean of six biological repetitions, including ten plants. Letters in the same column describe levels of statistical significance ( $p \leq 0.05$ ); values are means  $\pm$  SE. Disease symptoms related to virulence of *F. culmorum* are presented with more resolution and details in Figures S4 and S5 in Supplementary Materials.



Finally, plants that were diseased by inoculation of *F. culmorum* alone showed a drastic drop in the content of epidermal flavonols (Figure 3i). Interestingly, flavonol abundances were significantly up-regulated when the *Trichoderma* were co-inoculated with *F. culmorum*, except for *Tatr01* and *Tlen01*, whose levels stayed stable and similar to the control. It is plausible that these increases in flavonol productions have a significant impact on the resistance of wheat induced by these *Trichoderma*, as it has been observed in other positive biotic interactions involving *Trichoderma* spp. or symbionts [110–112,135,136]. Finally, the synthesis of these secondary metabolites involves the intervention of several specific enzymes (phenylpropanoid pathway). Their regulation also includes accumulation levels, which are ensured by the transcriptomic regulation of their related encoding genes. These genomic regulations will be discussed in greater detail in the next item.

#### 3.4.2. *Trichoderma* Display Antagonistic Abilities In Vitro against *F. culmorum* Growth

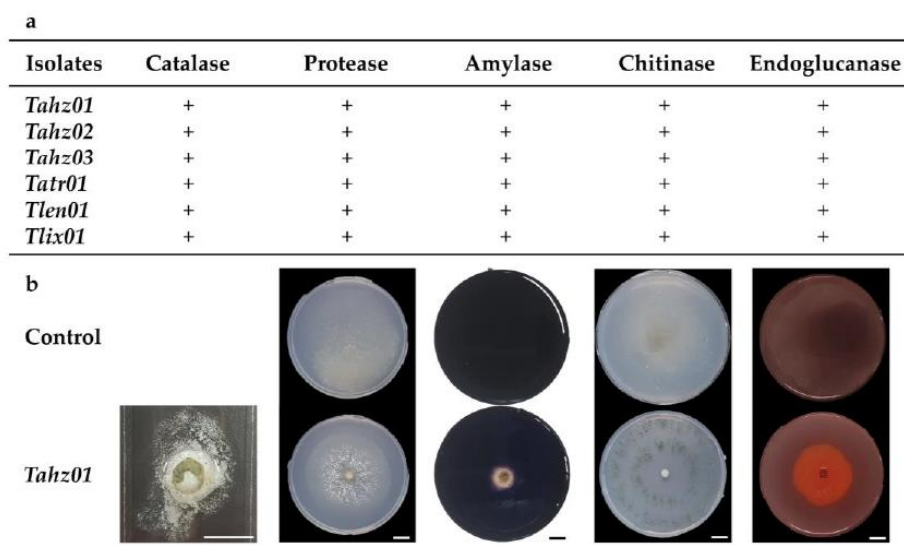
The antagonistic ability of the six native strains against *F. culmorum* was evaluated using in vitro dual culture assay. All the evaluated strains were capable of reducing *F. culmorum* growth. The inhibition rate (IR) was above 50%, indicating that all of the isolates exhibited high antagonistic activity. The most effective strain was *Tlix01* with 73.8% IR, and that was only significant with *Tahz03*, which showed the lowest IR (57.8%) (Figure 5; Figure S5 in Supplementary Materials). In addition, the results of the determination of diffusible metabolites demonstrated that the growth of *F. culmorum* was inhibited by at least 43.5%. This could be explained by the fast growing ability of *Trichoderma* to quickly colonize the surface and outcompete for resources, producing metabolites that lead to the suppression of the growth of *F. culmorum* [137].



**Figure 5.** In vitro antagonistic activity of *Trichoderma* isolates against *F. culmorum* on PDA medium after 7 days of confrontation (28 °C). (a) Antagonism was highlighted after direct confrontations of mycelia or indirect confrontations with volatile and diffusible *Trichoderma*'s metabolites. (b) Photographic examples of antagonistic activities with *T. afroharzianum* (*Tahz01*). Data correspond to the mean of six biological repetitions. Letters in the same column describe levels of statistical significance ( $p \leq 0.05$ ); values are means ± SE ( $n = 6$ ). Scale bars in photographs represent 1 cm. Antagonism activity of each *Trichoderma* isolate is presented in Figures S5 and S6 in Supplementary Materials.

The method used to determine volatile metabolites proved that all tested *Trichoderma* strains were able to inhibit *F. culmorum* development by 25.2% to 51.8%, with a significant difference between *Tatr01* and *Tahz03*, respectively (Figure 5a,b; Figure S6 in Supplementary Materials). *Trichoderma* species produce various secondary metabolites, such as diffusible and volatile organic compounds (VOCs) [138], and among them, a group of more than 500 carbon-based compounds is able to diffuse into the atmosphere and soil and/or is solubilize in water. These compounds are known as microbial volatile organic compounds (mVOCs), and their biosynthesis is dependent on strains and environmental conditions [24,108]. They display multiple biological functions, such as enhancing plant growth and resistance [108,139,140], and are harmful to a broad spectrum of plant pathogens [24,29,140] or both [141]. The molecular diversity of VOCs is remarkable; it includes (thio)alcohols, aldehydes, heterocycles, hydrocarbons, ketones, phenols, thioesters and a plethora of derivatives [142,143]. Our study has demonstrated the ability of the *Trichoderma* isolates to produce volatile and soluble mVOCs, which would weaken *F. culmorum* mycelia development to be vulnerable to hydrolytic enzymes. These mycoparasitic events would lead to the successful inhibition of *F. culmorum* growth, as previously observed in the interaction *Trichoderma-Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch [144]. In addition, we do not exclude the possibility that some of the emitted mVOCs are involved in the biostimulation of seed germination and seedling growth, especially in the presence of *F. culmorum*, as the general metabolism of *Trichoderma* is influenced by the roots of its host [145,146], as well as its potential prey including *Fusarium graminearum* [147]. This hypothesis would partly explain the PGP ability of *Tlix01*, where mVOCs could compensate for the absence of IAA-related indolic metabolites in this strain.

Along the same lines of exploring *Trichoderma* weapons used in the control of *F. culmorum* development, qualitative determination of enzymes, presumably involved in the antagonist activity of these isolates, revealed positive results illustrated by bubbling for Catalases and a halo of degradation inside the mycelial growth zone for Endoglucanases, Proteases, Chitinases and Amylases production (Figure 6).



**Figure 6.** (a) Extracellular enzymes produced by the six *Trichoderma* isolates. “+” means a positive result for the enzyme production. (b) Photographic examples of the qualitative assay of extracellular enzyme production in the absence of fungal isolate (Control) or in the presence of *Trichoderma afroharzianum* (*Tahz01*). Scale bars in photographs represent 1 cm.

These enzymes are produced as part of *Trichoderma* metabolism to obtain nutrients and to defend themselves against other microorganisms. Catalases, which are oxidative enzymes, have been shown to be involved in its biocontrol activity against *F. culmorum*, while the hydrolytic enzymes are secreted to break down *Fusarium* cell walls to get access to nutrients and help thus to reduce the severity of *Fusarium* infections. We hypothesize that these lytic enzymes (which are primarily involved in the extracellular digestion of *Trichoderma*) act in concert with various antagonistic metabolites (mVOCs) to take part in the mechanisms that drive *Trichoderma*'s hyperparasitism activities against *F. culmorum*.

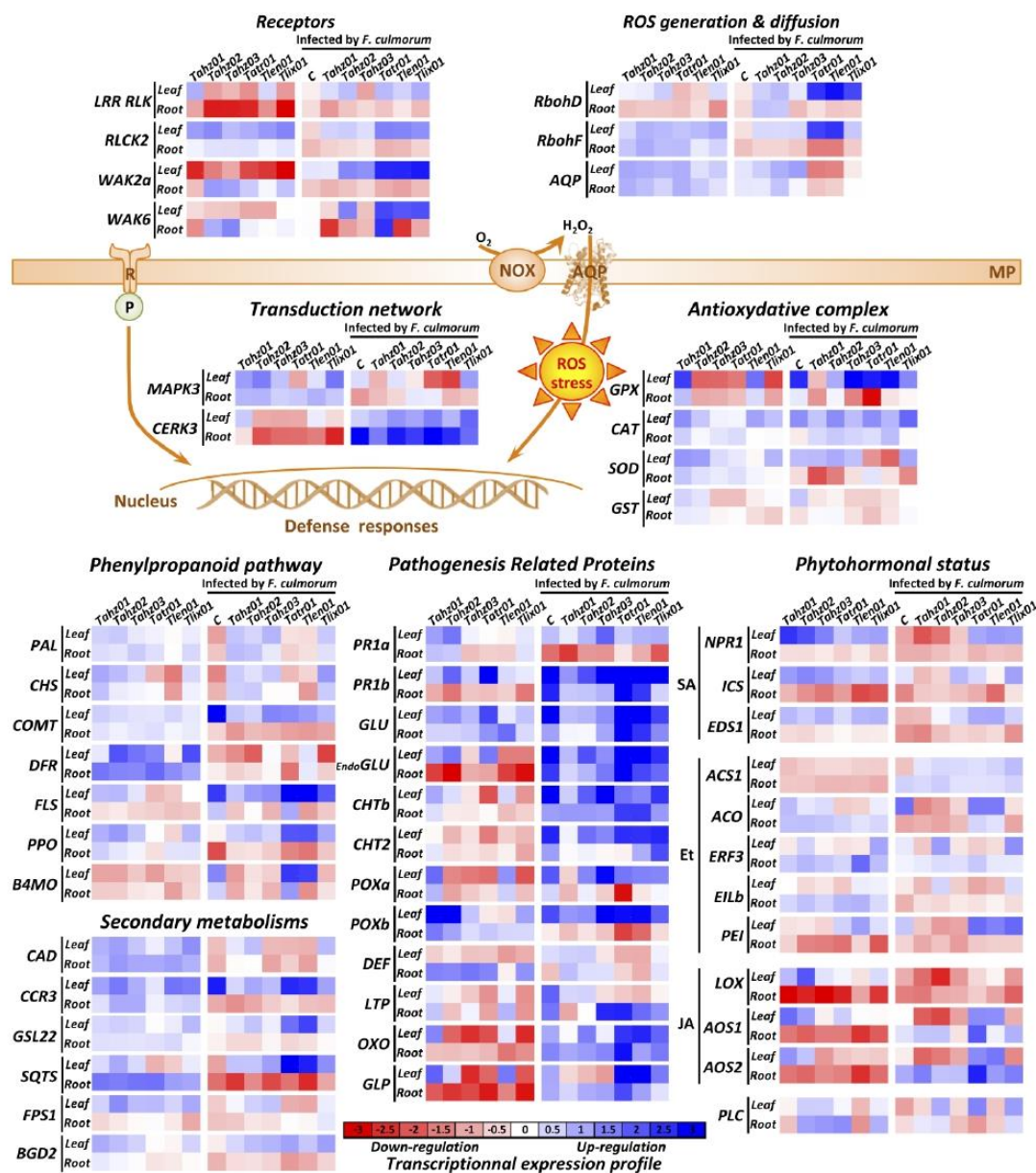
### 3.4.3. *Trichoderma* Strains Stimulate the Wheat Immune Responses

#### General Consideration

As for the biostimulation of plant defenses, all isolates significantly modulated the transcriptional expressions of genes involved in the system-wide immunity of wheat (all  $p$ -values < 0.05) (Figure 7; Table S2 in Supplementary Materials). Plant defenses are remarkably diverse, and the ways in which they are regulated are also remarkably varied and complex. They involve multiple pathways (viz., PR proteins, secondary metabolites, peritonal reinforcements, reactive oxygen species (ROS)) inherent to the recognition of bioagents, which, in our study, correspond to both pathogenic (*F. culmorum*) and beneficial agents (*Trichoderma* spp.). The accumulation of plant defenses is one among cellular responses that are set off by the recognition of external agents or substances and the self-recognition of plant molecules released by itself during the interaction such as stress phytohormones (SA, JA, Et, IAA, etc.), ROS with the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and/or various metabolites coming from microorganisms living on the host plant. The defense markers we selected for this study are common and cover several defense pathways (PR-proteins, phenylpropanoids, sesquiterpenoids, oxidative stress, recognition and signal transduction).

Molecular analysis was carried out on the roots and leaves of 21-day-old seedlings grown from seeds that were coated with the six *Trichoderma* isolates. An overview of transcriptional data showed that all targeted molecular markers were significantly modulated by the application of fungus (*Trichoderma*/*Fusarium*) independent of analyzed tissues. The modulations are highly diversified, with positive and negative kinetics reflecting the systemic regulation of the defense responses established by the host, which perpetuate over time during plant growth. These physiological features highlight the complexity and richness of the molecular responses that the plants deploy to provide a general resistance phenotype correlated to the BCA capacities of *Trichoderma* or the disease susceptibility caused by the virulence of *F. culmorum*.

Another general observation is that *Trichoderma*, when co-inoculated with *F. culmorum*, significantly enhanced the expression of some of the positive modulations that were recorded in the case of inoculation with only *Trichoderma* or even completely reversed other transcriptional expression trends induced by *F. culmorum* when inoculated alone (down- vs. up-regulations, and vice versa). These cellular responses clearly demonstrated that *Trichoderma* strains triggered deep and long-lasting transcriptional reprogramming of genes involved in plant immunity of wheat seedlings that were infected with *F. culmorum*. The reprogramming concerned all cellular processes: recognition (e.g., *LRR*, *RLK*, *RLCK* and *WAK6*), transduction pathways (*CERK3*), oxidative burst (ROS generation with *RbohD* and *-F*, and the antioxidant system with *GPX* and *CAT*), accumulation of defenses (secondary metabolisms with *PAL*, *CHS*, *GST* and *COMT*, as well as PR-proteins with *DEF* and *LTP*), and modulation of phytohormonal balances (*ACO* and *AOS2*).



**Figure 7.** Defense-related gene modulation in wheat roots and leaves following fungal inoculations with *Trichoderma* isolates alone or in combination with *F. culmorum*. Organs sampled for molecular analyses came from plants used for physiological and morphological analyses. Transcript levels for each gene were estimated using real-time *q*RT-PCR analyses and normalized by the expression of three housekeeping genes. Relative transcript abundance rates were obtained by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Data correspond to the mean of three independent biological experiments; each biological repetition corresponds to a mix of 5 plants. Colors represent the levels of transcriptional expressions (blue, up-expression; red, down-expression, compared with healthy samples treated with sterile PDB). NOX, NADPH oxidase; AQP, Aquaporin. Statistical analyses were detailed in Table S2 in Supplementary Materials. Gene acronyms and related primers used for *q*PCR amplification are given in Table S1 in Supplementary Materials. SA, salicylic acid; Et, Ethylen; JA, Jasmonates.

When analyzing transcriptional responses at the *Trichoderma* isolates level, it is interesting to note that *Tatr01* and *Tlen01* exhibited contrasting profiles to those observed with the rest of the isolates. This was significant for genes involved in the recognition process and transduction pathways (e.g., WAKs, MAPK3, *WSF* and *NFLX*), oxidative stress (*RbohF*, *AQP*, *GPX*, *SOD* and *GST*), defense metabolites (*PAL*, *FLS*, *PPO*, *CCR3*, *GSL22*, *SQTS*, *CHS*, *CCR3*, *GSL22*, *PPO*, *PR1b*, *GLU*, and *OXO*) and phytohormonal balances (mainly Et- and JA-dependent pathways with *ACO*, *LOX*, *AOS1* and -2). These two isolates (*Tatr01* and *Tlen01*) were protective, similar to the other isolates, against the emergence of morbid disease symptoms (root and leaf rots) caused by *F. culmorum* (Figure 4b; Figure S3 in Supplementary Materials) but not against growth delays due to the presence of *F. culmorum* on plants (Figure 3). Although these are correlations, this finding may be explained by the fact that *Tatr01* and *Tlen01* have affected the transduction pathways inherent to plant growth and immunity in a different way than other isolates. This data is a prerequisite for guiding the selection of strains to be developed in the field. To our knowledge, such contrasting strain-dependent modulations in the instruction of different physiological functions are rarely demonstrated or further discussed in wheat interacting with BCAs in general and with *Trichoderma* in particular.

#### *Trichoderma* Isolates Stimulate the Systemic Accumulation of Wheat Defenses

Plant defenses are expressed sequentially, temporally and spatially. *Trichoderma* inoculation in the presence or absence of *F. culmorum* modulated all the targeted markers. Based on our transcriptomic results, we proposed a putative model of the long-term molecular interaction between above-ground and underground parts of wheat seedlings grown from seeds coated with the six *Trichoderma* isolates.

The expression levels of the defenses encoding genes resulting from the recognition of the agents by plant receptors (R) would participate in triggering both the root colonization of *Trichoderma* and the systemic modulation of defenses accumulation which then leads to the resistance of wheat against *F. culmorum*. Different molecular modalities of *Trichoderma* spp. plant recognition and its related defense elicitation have been described, for example, involving the Sm1/Epl1 elicitors [148,149]. Consistent with several transcriptomic and proteomic studies [30,150], the six *Trichoderma* isolates induced the modulation of several plant resistance (R) genes, which was correlated with the activation of a wide range of plant defenses and a high physiological level of resistance. It is then also plausible that this resistance acquisition should be extended to pathosystems other than *F. culmorum* (and of which WAK2 would be one of their recognition systems [151]), such as *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (LRR RLK) [152], *Puccinia triticina* (WAK6) [153], *Rhizoctonia cerealis* (RLCK) [154], and those whose related receptor-like kinases encoding genes are significantly up-regulated by certain *Trichoderma* strains alone and/or in the presence of *F. culmorum*. However, the enhancement of the effector-triggered resistance relies on the highly specific interaction between the microorganism's effectors and the potential plant's receptors (R). The fact that we observe diversified transcriptional patterns of the (R)-gene responses between strains suggests that each isolate has deployed specific effectors that interfere with the plant effector-triggered immunity (ETI). It will be very informative to further characterize the effectors involved in the interaction of the most efficient *Trichoderma* strains on wheat.

Receptors perceive and process signals from invading microorganisms in diverse pathological and beneficial systems. Among the subsequent cellular responses induced by our *Trichoderma* isolates, we observed an increase in transcription of wheat respiratory burst oxidase homologues (i.e., NADPH oxidase with the *Rboh-D* and *-F* subunits) and proteins involved in ROS diffusion (*AQP*) and scavenging (antioxidative complex). These modulations mainly involved up-regulations that led to the modification of the global oxidative state of plants that were linked to a generation of ROS. They occurred in the roots (except for *Rboh-D*) and in the leaves, where they were correlated to the modulation of the SA-dependent markers. Indeed, SA is a key mediator in eliciting an oxidative burst in challenged plants, thus regulating antioxidant metabolism. In this respect, these results

agree with those which were reported in wheat inoculated with different *Trichoderma* species where the application of *Trichoderma* triggers both oxidative stress and systemic defense pathways in wheat seedlings [155].

Besides the toxic and antimicrobial aspects of ROS, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is a key player in the complex signaling network of plant responses to abiotic and biotic stresses. It is, therefore, essential to maintain ROS at sub-toxic levels, which reflects a delicate balance between ROS production (involving the activation of ROS-generating enzymes under stress and the unavoidable production of ROS during basic cellular metabolism) and ROS elimination pathways. Here, our experiments demonstrated that *Trichoderma* induced persistent and latent oxidative stress in wheat, but this stress was counteracted by the production of antioxidant enzymes (*CAT* and *SOD*) that then reduced the oxidative damage linked to the high chemical reactivity of ROS. In addition to their role in the elimination of *F. culmorum*, these ROS and in particular  $H_2O_2$ , would also participate in the changes of the plant's phytohormone balances rather than in the elimination of *F. culmorum*, which, subsequently, would notably activate the accumulation of defenses. Furthermore,  $H_2O_2$  is a relatively stable molecule over time, and it has the distinctive feature of freely diffusing through the plasma membrane. However, its diffusion in tissues should and could be regulated by peroxyporins. Peroxyporins are specific aquaporins (AQP) that belong to the Major Intrinsic Protein (MIP) family [156]. Aquaporins are studied in a plethora of cellular physiological pathways due to their ability to regulate water transport in biological systems. However, peroxyporins play a relevant role in controlling  $H_2O_2$  permeability, and they ensure the ROS outcome during oxidative stress, including that related to the initiation of the disease immune responses by plant cells [157]. AQP expressions were modulated by all isolates, both in roots and leaves, implicating them in the diffusion of many solutes and also  $H_2O_2$ , reinforcing the hypothesis that ROS-dependent signals may have influenced the overall resistance responses of the plant. It is, therefore, interesting to correlate the cellular pathway inherent to the production, diffusion and pro-oxidative control of ROS with the resistance of wheat against *F. culmorum* by *Trichoderma*.

Concomitant with oxidative stress, the strong induction of various defense pathways is a key plant defense strategy to limit pathogen development. It involves the production of a large panel of "biopesticide" secondary metabolites, including phenylpropanoids, terpenoids (*SQTS*, *FPS1*), and enzymes involved in the biosynthesis of monolignol (Cinnamyl alcohol dehydrogenase, *CAD*, and Cinnamyl coenzyme reductase 3, *CCR3*), which participate in cell wall strengthening and callose apposition (*GSL22*). These genes are mainly induced in leaves and roots, and a few of them may also be repressed but with similar modulation rates.

PAL and CHS are key enzymes of the phenylpropanoid biosynthesis pathway, providing precursors for the synthesis of antimicrobial phenolics such as lignins, flavonoids, isoflavonoids and coumarins. Furthermore, these enzymes are de facto involved in the SA defense pathway since SA is synthesized from phenolic derivatives. However, more broadly, it should be emphasized that several genes involved in the biosynthesis of flavonoids and terpenoids were up-regulated by several *Trichoderma* isolates, thus reinforcing the relevance of such a pathway during the Wheat–*Trichoderma* interaction leading to efficient systemic resistance against *F. culmorum*. These transcriptional up-regulations are correlated with the leaf epidermal flavonol contents recorded in the leaves of plants treated with both *Trichoderma* isolates alone or with *F. culmorum* (Figure 3i).

The intertwining of enzymatic markers involved in different metabolic pathways under stress seems to contribute to disease resistance. For instance, *CAD* and *CCR3*, two key enzymes involved in lignin biosynthesis, interplay in apoplasm with the oxidative enzymes Peroxidase (*POX*) and Polyphenol oxidase (*PPO*) in the presence of ROS ( $O_2^{\circ-}$ ,  $^{\circ}OH$ ) and  $H_2O_2$  to catalyze the formation of lignins and their crosslinking with other oxidative phenols, proteins and molecular components of the cell wall. These biochemical interactions contribute to the reinforcement of the cell wall and to the callose apposition process itself, assisted by Glucan synthase-like activities (*GSL22*). Interestingly, these key enzymes

display significant up-coreulation in the roots and leaves elicited by *Trichoderma* alone or with *F. culmorum*. In addition, their accumulation patterns are analogous to Superoxide dismutase (SOD) enzymes that are responsible for the dismutation of superoxide radicals into oxygen and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A contrario, the expression profile of these enzymatic markers was significantly inhibited in the roots of *Trichoderma-F. culmorum* co-inoculated plants, compared to *F. culmorum* alone. These expressions are possibly related to the toxic impact of certain enzymes on the development of microorganisms in general and on the long-term *Trichoderma* colonization in roots in particular. For example, PPO activity oxidizes phenols into quinones, which are more toxic to microorganisms than the original phenolic compounds [158]. Likewise, POXs belong to a large multigene family that participates in several physiological processes, such as the synthesis of phytoalexins, lignin and suberin, the cross-linking of cell wall components and the rapid synthesis of ROS derivatives by oxidative burst contributing to cell death [159]. All these molecular responses provide a physical barrier to and/or substantially limit pathogen spread and invasion throughout the plant. Finally, their inhibition in co-treated root correlates with the down-regulation of the SA- and JA-dependent signaling pathways, possibly to finely control the abundance of related defenses in the roots which are in direct contact with the fungal protagonists.

As for the pathogenesis-related (PR) proteins, which are grouped into 17 families based on their sequence and biological activities, they are components of an early response toward pathogen infection, playing a key role in pathogen-spread limitation [160]. Phytohormones (SA, JA and Et) with ROS are involved in the signal transduction network and the accumulation of PR-proteins primed by *Trichoderma* spp. [32,161–163]. In our assay, PR-protein transcriptional accumulations were significantly activated in leaves challenged by *Trichoderma* alone, while these expressions were strongly potentiated in the leaves and also in roots in the case of co-treatment *Trichoderma-F. culmorum*. Finally, co-regulations of PR-proteins, as well as other defense markers, could be pointed out mainly in the leaves challenged by *Trichoderma* alone; it concerns *CHTb*, *POXa*, *DEF*, *LTP*, *OXO* and *GLP*, with *LRR-RLK*, *CERK3* and *GPX*. Interestingly, these expression patterns are quite connected to the modulation of the JA-dependent signaling pathways (*AOS1* and *AOS2*), knowing that among these markers *CHTb* (PR-4), *GLP* and *AOS2* are also positively induced by fungal pathogens through the JA signaling pathway [164]. To our knowledge, these markers do not seem to be linked to a common signaling pathway. However, the fact that these profiles are correlated may underline key regulatory points in the establishment of certain disease resistance, such as those involved in the role of the LRR-RLK receptor against *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*, the agent of wheat powdery mildew.

Finally, we do not omit that some defenses are weakly/unmodulated or significantly inhibited during the interaction in roots in similar patterns to those recorded with *F. culmorum* alone (e.g., *C4L*, *CCR3*, *GSL22*). It is plausible that these defenses remain under the control of the pathogen, even with the strong regulations that *Trichoderma* exerted on the global signaling pathways in wheat seedlings. However, these modulations could also be related to the successful, long-lasting *Trichoderma* establishment on or in these plant organs. We can then assume that certain specific defenses are “effective” against *F. culmorum* (correlated to their down-regulation) and that they would be equally toxic to *Trichoderma*. For example, the expression profiles of certain PR-proteins (*PR1b*, *GLP*, *OXO*), key biosynthetic steps of secondary metabolites or the sextet (*SOD-PPO-POX-CCR3-CAD-GSL22*) would fit this hypothetical scenario. As demonstrated, even though these defenses can be up-regulated rapidly by *Trichoderma* treatments [30,116], their expression is reprogrammed over time to perpetuate an optimal mutualistic interaction that the plant maintains with its beneficial microorganisms. From this perspective, the mechanisms deployed by *Trichoderma* to persist in the root system as an avirulent symbiont are not yet fully revealed. It is highly probable that it depends on “virulence effectors” involved in plant defense suppression, whose nature and mode of action remain to be deciphered.

### *Trichoderma* Isolates Influence the Wheat Phytohormone Balances

Root penetration by *Trichoderma* is reported to transiently induce the expression of defense-related genes and the production of antimicrobial compounds. Our results demonstrated here imply that root colonization by *Trichoderma* after seed coating application maintained the transcription of many defense-related genes at significant levels for a relatively long period of time (21 days). These observations suggest that the long-term response of wheat to *Trichoderma* may involve phytohormone signaling.

In addition to the primary mechanisms of elicitor recognition by plant receptors, complex phytohormonal adjustments occur that supplement or potentiate the primary signals of direct microbial recognition. It is unanimously recognized that beneficial agents in general, and *Trichoderma* in particular, have the potential to profoundly influence the phytohormonal balances of plants involved in local and systemic signaling responses to stress. These balances include salicylic acid (SA)- and jasmonate (JA)/ethylene (Et)-mediated signaling responsible for the Systemic Acquired Resistance (SAR) and Induced Systemic Resistance (ISR), respectively, making plants resistant to a broad spectrum of pathogens [116,165,166]. Generally, SAR is induced by fungal biotrophic pathogens, and ISR usually relies on the interaction of plants with symbionts or necrotrophic microorganisms. However, *Trichoderma* spp. are reported to engage several hormonal-signaling pathways to instruct the elicitation of disease resistance in plants. They act in synergy and in balance with each other, and they depend closely on the strains, the plant genotypes, the environment (including the challenged pathogen) and the temporal modalities of the interaction [116,167,168]. We explore these balances here through the SA- and JA/Et-mediated signaling pathways.

Concerning the SA-dependent pathway, *Trichoderma* isolates the negatively modulated *NPR1* and *ICS* in the roots, whether inoculated alone or with *F. culmorum*. These modulations are quite diversified in the leaves, being positive for simple *Trichoderma* inoculation or with inhibitions or activations for co-inoculation with *F. culmorum*, but they are strain-dependent. The down-regulation of the SA pathway markers recorded in our work should not be opposed to the key role played by SA in the early stages of root colonization by beneficial microorganisms where SA accumulation and/or transcriptional up-regulation of SA pathway-dependent genes are reported. Early phases involve plant responses that resemble those induced by biotrophic pathogens present in the intercellular spaces, similar to many beneficial agents [169]. These first phases are correlated with transitory accumulations of SA that may be responsible for the accumulation of plant defenses. In an interaction involving *Trichoderma*, these common physio-molecular responses would prevent the fungus from entering the apoplastic space of the epidermal and cortical tissues towards the root vascular system [170]. Here, our study targeted the defense responses of 21-day-old wheat seedlings. This specific temporality of our analyses would then explain the weak modulation and inhibition of several defenses observed in roots and could also be related to the successful and long-lasting establishment of *Trichoderma* on these plant organs. Such partial suppression of SA-dependent responses in plants also appears to be necessary for the onset of symbiotic associations [171,172]. Moreover, these organ- and strain-specific transcriptional responses are very informative. They highlight that isolates behave and/or are perceived differentially by the plant, which is dependent on their presence both alone or with their plausible prey (*F. culmorum*). This demonstrates the complexity of the interactions that beneficial agents establish with plants in the presence or absence of other protagonists and whose outcomes are closely dependent on the biotic and abiotic environments where these interactions take place.

The expression pattern of the JA/Et pathway markers allowed us to discover some interesting correlations. Ethylene (Et) is a phytohormone that regulates plant growth, development and senescence, but low Et concentrations in the root system are correlated with higher shoot growth. These molecular responses (along with the ecophysiological traits we recorded) have to be linked to the fact that many PGP microorganisms from the rhizosphere could reduce the levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), which is the precursor metabolite of Et, by producing the enzyme ACC deaminase (ACCD). *Trichoderma*



strains own this feature of Et regulation [173], regulating the level of ET in conjunction with other phytohormones involved in the growth process (GA3, CKs) [124,174]. This could be explained by the fact that *Tatr01* and *Tlen01* have induced an overexpression of *ACO* genes, which is correlated with a reduction in root growth (Figure 3d–f). In our analysis, it is interesting to note that the expression of *ACS* and *ACO* genes, which encode for enzymes involved in the last two key steps of the Et biosynthesis in plants, is apparently desynchronized between biological variations (i.e., inoculation alone or combined with *F. culmorum*). Similarly, the expression of regulatory factors known to be related to ethylene (Et)-mediated signaling (*ERF3*, *PIE*) have shown highly divergent profiles. These contrasting transcriptional profiles have not been over-interpreted to avoid making wrong conclusions, but they could plausibly be attributed to several global regulations. These regulations are generated from long-term transcriptional reprogramming of Et-signaling influenced by the general phytohormonal balances of plants, to which *Trichoderma* contributes with its own phytohormone-like production.

The same goes for the jasmonates (JA)-mediated signaling pathway. Jasmonates are a family of molecules derived from the lipid metabolism and subsequent peroxidation of membrane lipids caused by an oxidative burst. Jasmonates, in cooperation with other phytohormones (including SA), play an active role in the regulation of plant innate immune responses by controlling a cascade of complex physio-biochemical changes (metabolite accumulation and enzymatic activities) within the host plant, which then contributes to the development of resistance/tolerance against a wide range of invaders [175,176]. In addition, jasmonates influence the regulation of mutualistic interactions between plant and their associated microbes in the roots and aerial parts. In this respect, the fact that *Trichoderma* would inhibit JA-dependent regulatory pathways (*LOX*, *AOS1* and -2) in the roots of wheat plants further mirrors the fact that mycorrhizal colonization is stimulated by low concentrations of jasmonates rather than higher ones. Concerning leaves, plant systemic resistance induced by *Trichoderma* spp. correlate with a significant increase in JA-related markers, which is consistent with several works [116,177]. However, a complete re-organization of the JA-marker transcripts accumulations occurs when *Trichoderma* is co-inoculated with *F. culmorum*, while *F. culmorum* alone displayed inhibitor activity on these JA-markers. These trends suggest the possible existence of cooperative interactions between the mutualistic plant symbiont (i.e., *Trichoderma*) and the roots of the host plant in response to *F. culmorum* infection through the emission of specific JA derivative metabolites such as the methyl jasmonates (MeJA). Both molecules are natural inducers of plant resistance and their concomitant application with *Trichoderma* spp. significantly improves the induction of plant immune responses [175,177]. In addition, MeJA also exhibits significant antimicrobial activities by inhibiting spore germination and mycelial development of various plant pathogenic fungi [178–180].

These modulations need to be analyzed in a more holistic sense. We have to mention that most of the studied *Trichoderma* species colonize either the root surface or the interior as endophytes [181,182], including in wheat [183]. However, within the soil fungal communities, *Trichoderma* spp. has a relatively low abundance in both agricultural [184,185] and natural ecosystems [186,187]. The act of seed coating guarantees the presence of *Trichoderma* in wheat tissues over time to ensure a long-lasting and systemic elicitation of plant responses. Among the early signaling-induced events related to the host-*Trichoderma* recognition, high levels of SA, Et and JA were observed in different parts of the plant [188,189]. While several studies have focused on the early (i.e., hours or days) and systemic elicitation of *Trichoderma* when inoculated on roots and/or leaves by transcriptomic or proteomic analysis, our study has the originality of providing new insights about these root and leaf responses when seeds are coated with *Trichoderma*. The isolates thus have time to acclimatize and settle in their edaphic environment while potentially colonizing the growing plant organs (i.e., coleoptiles, then all or part of the young seedling, including the roots). The result after 21 days of interaction in a greenhouse shows that plant response patterns related to phytohormonal defense regulations are highly diversified between pathways

(SA and JA/Et) and closely dependent on the applied strains. These responses are very complex to interpret, but growth and immune performances appear to be associated with the simultaneous transcript expression of SA and JA/Et defense-related genes, as well as with the expression of an oxidative burst and accumulation of antimicrobial metabolites. SA- and JA/Et-dependent signaling are often depicted as antagonistic, but here, their synergistic overlap seems to occur instead, as previously reported for some pathosystems [116,190,191]. However, although the induced SAR and IRS seem compatible in our study, the signaling pathways leading to plant resistance and growth are different and distinctly strain dependent. Furthermore, the complexity of the transcriptional responses observed would plausibly be linked to the interaction of two pools of phytohormones emitted during plant/*Trichoderma* interaction, i.e., the first emitted by the plant in response to the recognition and settlement of *Trichoderma* in the root, and the second emitted by the fungus to manipulate its (biotic) environment, and which, here, would fully integrate the signaling pathways of the plant. In other words, the global and systemic hormonal regulations observed in this study would be conditionally linked to the ability of *Trichoderma* to produce several phytohormones (such as ABA, CKs, GAs, SA, Et and IAA). The level of these phytohormones is strain-specific, and their cooperation synergistically modulates plant disease resistance and growth promotion [192].

Therefore, and consistent with what has been observed in other studies on tomato [193], cucumber [194] or olive [32], this evidence further underlines the key influence of *Trichoderma* on the overall phytohormonal balances that interconnect plant defense and development responses. The transcriptional expression levels of the markers studied here did not allow us to identify which phytohormone-like are mainly produced by the different *Trichoderma* strains, nor the way in which they cooperate to reach this effect on plant growth and defense promotion. Other ongoing research will quantify the phytohormone-like compounds produced by these beneficial isolates in order to identify their potential mode of action during the molecular dialogues of the defensive protection process in wheat.

### 3.5. Long-Lasting Root Installation of *Trichoderma* Isolates for a Sustainable Plant Protection

It should be noted that the physiological responses recorded here are expressed in the roots and leaves of wheat plants harvested after three weeks under greenhouse conditions and that the fungal treatments were carried out only on seeds.

Several events can explain the durability of the signal over time. Each *Trichoderma* isolate was detected in the roots of plants coming from seeds treated with that same strain (Figure S7 in Supplementary Materials). The same goes for the pathogen, which was only detected in the roots of plants originating or not from seeds previously treated with *Trichoderma* isolates. Regarding leaves, no PCR amplification signal was detected for all *Trichoderma* isolates and *F. culmorum* was detected in plants treated only with this pathogen. However, it is plausible that the isolates are also present on/in the aerial parts but at levels not measurable by the analytical approaches used here and/or that endophytic populations mask the signal. In this respect, these potential trace populations that would be controlled by the immune performance of plants stimulated by *Trichoderma* could conceivably still have a positive influence on the foliar defense responses by intensifying the primary systemic signals emitted by the roots during the interaction with *Trichoderma* isolates.

The prolonged presence of the fungal protagonists should thus have an influence (individually or synergistically) on the intrinsic “immune memory” of plant cells whose inhibitory feedback regulations have not yet been fully deployed. The combination of these two events can temporarily reduce the vitality of the growth of the plants. Plants actively prioritize defense over growth, and this prioritization and the associated growth trade-offs are regulated by crosstalk between plant hormones [195,196]. In our experimental context, these negative collateral effects were not observed with any of the beneficial interactions, and *Tahz01*, *-02* and *-03*, and *Tlix01* significantly improved plant growth dynamic (Figure 3). Therefore, this data is crucial to determining the choice of strains whose positive effect is closely linked to their ability to develop BCA and PGP capabilities simultaneously.

Finally, in our study, where in planta experiments were conducted in a growth chamber, *F. culmorum* was traceable in diseased plants, as well as in symptomless plants that were previously treated with each *Trichoderma* isolate. This data is of great significance because the fact that *Trichoderma* persistently colonizes the roots alongside the pathogen suggests the relevance of using these agents as a form of biocontrol, particularly for a pathogenic population, and/or in the modulation of the expression of pathogenicity genes that instruct the level of pathogen's aggressiveness. The molecular dialogues that regulate cellular responses in each of the interacting fungal protagonists open up many remarkable exploratory avenues, which will be studied in the future.

#### 4. Conclusions

To conclude, this study was conducted to isolate local *Trichoderma* spp. from rhizospheric soil of an old wheat variety (cultivated in an organic farming system) in order to use them as Plant Growth Promoting Fungi (PGPF) and Biocontrol Agents (BCAs) against *F. culmorum*, the agent responsible for Fusarium seedling blight disease in wheat (FSB). Of all the *Trichoderma* isolates, six strains were tested in this study. The results showed that seed coating with *Trichoderma* strains before sowing was efficient in promoting plant growth by increasing shoot/root length, total fresh/dry weight, total chlorophyll content and nitrogen plant status (NBI). In addition, strains appeared to be efficient biological control agents in their capacity to inhibit *F. culmorum* growth in vitro and by reducing disease severity under controlled environmental conditions. Moreover, the strains were able to induce systemic and long-lasting immune performance in the roots and leaves of 21-day-old seedlings. These physiological characteristics correlated with profound transcriptional changes in the gene encoding for plant defenses and reprogramming of hormonal balances, leading to simultaneous expressions of SA- and JA/Et-dependent pathways. The spatio-temporal coordination of these cellular responses conferred systemic resistance to wheat seedlings where the levels of its protective effect depended on the *Trichoderma* strain tested.

This research allowed us to explore the local *Trichoderma* strains which colonize the wheat rhizosphere and examine their performance as PGPF and BCAs. Their successful use here needs to be followed up by further analysis to fully understand the nature of the molecules (diffusible and volatile metabolites) involved in the biocontrol activity, as well as their impact on wheat growth and resistance performances in the field. In this respect, new studies focused on deciphering the molecular dialogue between the protagonists (*Fusarium*, *Trichoderma* and wheat) are in progress to better understand and valorize the isolated *Trichoderma* strains, which will then potentially guide their industrial application.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11061512/s1>, Figure S1: Tunisian site of origin of the *Trichoderma* strains used in this work; Figure S2: Macroscopic and microscopic aspects of the *Trichoderma* isolates; Figure S3: Root and leaves disease symptoms in wheat (Khar variety) caused by *Fusarium culmorum*; Figure S4: Bioprotection effect of the six *Trichoderma* isolates against *F. culmorum* infestation on wheat ("Khar" variety) in axenic environment; Figure S5: Direct mycelial confrontation between *Trichoderma* isolates and *F. culmorum*; Figure S6: Indirect antagonistic activity related to emission of volatile and diffusible organic compounds by *Trichoderma* isolates against *F. culmorum*; Figure S7: Qualitative molecular characterization of the presence of *Trichoderma* or *F. culmorum* isolates in the aerial and underground parts of wheat plants 21 days after seed treatment with *Trichoderma* and/or *F. culmorum* isolates; Table S1: Primers used for qPCR amplification of the wheat defense-encoding genes; Table S2: Statistical analyses of the transcript accumulation induced by *Trichoderma* isolates and/or *F. culmorum*.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.S., M.F., L.B. and J.-S.V.; Methodology, M.S., M.F., L.B. and J.-S.V.; Software, P.L.; Validation, M.F., L.B. and J.-S.V.; Formal analysis, M.S.; Resources, N.O.B. and J.-S.V.; Data curation, H.C., P.L. and J.-S.V.; Writing—original draft, M.S. and J.-S.V.; Writing—review & editing, M.F., L.B., N.O.B., M.K., H.C., P.L. and J.-S.V.; Supervision, P.L. and J.-S.V.; Project administration, J.-S.V.; Funding acquisition, J.-S.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the French resources of the project “Pack Ambition International 2019” (ANR grant n° P0100003), co-financed by the University of Clermont-Auvergne and the French Region “Auvergne-Rhône-Alpes”, and the I-SITE CAP 20-25 (ANR grant 16-IDEX-0001) Emergence 2017 of the University of Clermont-Auvergne.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article or supplementary material.

**Acknowledgments:** The authors thank those contributors who made the *Trichoderma* genome data accessible in the public databases of NCBI. We are grateful to Amélie COSTON, Céline SAC, Amadou Bamba NIANE and Jerome FRANCHEL for their technical assistance in plant growth and in molecular biology, Nicole BRUNEL-MICHAC for her technical assistance in the microscopy and Norbert FRIZOT for his technical computer support services. The authors wish to acknowledge Hannah REY YANG for providing the final linguistic revision of the manuscript and the technical support of the “Service Commun des Langues Vivantes” of the Université Clermont Auvergne. We are grateful to the “Mésocentre Clermont-Auvergne” and the “Plateforme AuBi” of the Université Clermont Auvergne for providing help, computing and storage resources. Computations have been performed on the supercomputer facilities of the “Mésocentre Clermont-Auvergne” of the Université Clermont Auvergne. We are also grateful to the three anonymous reviewers for their constructive comments and helpful suggestions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

- Huffman, W.E.; Evenson, R.E. Structural and productivity change in US agriculture, 1950–1982. *Agric. Econ.* **2001**, *24*, 127–147. [CrossRef]
- Weese, D.J.; Heath, K.D.; Dentinger, B.T.; Lau, J.A. Long-term nitrogen addition causes the evolution of less-cooperative mutualists. *Evolution* **2015**, *69*, 631–642. [CrossRef] [PubMed]
- Vaccino, P.; Laino, P.; Limonta, M.; Gerna, D.; Vaccino, P. Morpho-physiological and qualitative traits of a bread wheat collection spanning a century of breeding in Italy. *Biodivers. Data J.* **2015**, *3*, e4760. [CrossRef] [PubMed]
- Slama, A.; Ben Salem, M.; Ben Naceur, M.; Zid, E. Les céréales en Tunisie: Production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Sécheresse* **2005**, *16*, 225–229.
- ONAGRI. *Observatoire Nationale de l’Agriculture, Annuaire Statistique*; ONAGRI: Tunis, Tunisia, 2016; 190p.
- Gargouri, S.; Hajlaoui, M.R.; Guermech, A.; Marrakchi, M. Identification des espèces fongiques associées à la pourriture du pied du blé et étude de leur répartition selon les étages bioclimatiques en Tunisie. *Bull. OEPP/EPP/EPPO Bull.* **2001**, *31*, 499–503. [CrossRef]
- Wiese, M.V. *Compendium of Wheat Diseases*; The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, 1987; 112p.
- Hollaway, G.J.; Evans, M.L.; Wallwork, H.; Dyson, C.B.; McKay, A.C. Yield Loss in Cereals, Caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, Is Related to Fungal DNA in Soil Prior to Planting, Rainfall, and Cereal Type. *Plant Dis.* **2013**, *97*, 977–982. [CrossRef]
- Antalová, Z.; Bleša, D.; Martinek, P.; Matušinsky, P. Transcriptional analysis of wheat seedlings inoculated with *Fusarium culmorum* under continual exposure to disease defense inducers. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0224413. [CrossRef]
- Khemir, E.; Chekali, S.; Moretti, A.; Gharbi, M.S.; Allagui, M.B.; Gargouri, S. Survival of *Fusarium culmorum*, causal agent of foot and root rot of cereals, on wheat, barley and oat residues in Tunisia. *Ann. L’INRAT* **2018**, *91*, 162–172.
- Simpson, D.R.; Thomsett, M.A.; Nicholson, P. Competitive interactions between *Microdochium nivale* var. *majus*, *M. nivale* var. *nivale* and *Fusarium culmorum* in planta and in vitro. *Environ. Microbiol.* **2004**, *6*, 79–87. [CrossRef]
- Li, X.; Zhang, J.B.; Song, B.; Li, H.P.; Xu, H.Q.; Qu, B.; Dang, F.J.; Liao, Y.C. Resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat is associated with activation of a cytochrome P450 gene. *Phytopathology* **2010**, *100*, 183–191. [CrossRef]
- Pirgozliev, S.R.; Edwards, S.; Hare, M.C.; Jenkinson, P. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* **2003**, *109*, 731–742. [CrossRef]
- Dal Bello, G.M.; Mónaco, C.I.; Simón, M.R. Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 627–636. [CrossRef]
- Khemir, E.; Chekali, S.; Moretti, A.; Gharbi, M.S.; Allagui, M.B.; Gargouri, S. Impacts of previous crops on inoculum of *Fusarium culmorum* in soil, and development of foot and root rot of durum wheat in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* **2020**, *59*, 187–201. [CrossRef]
- Bhaskara Reddy, M.V.; Arul, J.; Angers, P.; Couture, L. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1208–1216. [CrossRef] [PubMed]
- Khan, M.R.; Fischer, S.; Egan, D.; Doohan, F.M. Biological control of *Fusarium* seedling blight disease of wheat and barley. *Phytopathology* **2006**, *96*, 386–394. [CrossRef] [PubMed]

18. Wisniewska, H.; Kowalczyk, K. Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to *Fusarium culmorum* and powdery mildew. *J. Appl. Genet.* **2005**, *46*, 35–40. [[PubMed](#)]
19. Gharbi, M.S.; El Felah, M. Les céréales en Tunisie: Plus d'un siècle de recherche variétale. *Ann. L'INRAT* **2013**, *86*, 45–68.
20. Giorgi, F. Climate change hot-spots'. Adaptation to climate change: Development of a national strategy for agriculture, ecosystems and water resources in Tunisia 2005 to December. *Geophys. Resour. Lett.* **2007**, *33*, 707–715.
21. Woo, S.L.; Ruocco, M.; Vinale, F.; Nigro, M.; Marra, R.; Lombardi, N.; Pascale, A.; Lanzuise, S.; Manganiello, G.; Lorito, M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycol. J.* **2014**, *8*, 71–126. [[CrossRef](#)]
22. Awad-Allah, E.F.A.; Mohamed, I.A.A.; Allah, S.F.A.A.; Shams, A.H.; Elsokkary, I.H. *Trichoderma* Species: An Overview of Current Status and Potential Applications for Sustainable Agriculture. *Indian J. Agric. Res.* **2022**, *1*, 1–10. [[CrossRef](#)]
23. Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C.; Codón, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **2004**, *7*, 249–260. [[PubMed](#)]
24. Li, N.; Alfiky, A.; Wang, W.; Islam; Nourollahi, K.; Liu, X.; Kang, S. Volatile Compound-Mediated Recognition and Inhibition between *Trichoderma* Biocontrol Agents and *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mendoza-Mendoza, A.; Zaid, R.; Lawry, R.; Hermosa, R.; Monte, E.; Horwitz, B.A.; Mukherjee, P.K. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biol. Rev.* **2018**, *32*, 62–85. [[CrossRef](#)]
26. Halifu, S.; Deng, X.; Song, X.; Song, R.; Liang, X. Inhibitory Mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia Solani*. *Plants* **2020**, *9*, 912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rao, Y.; Zeng, L.; Jiang, H.; Mei, L.; Wang, Y. *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing Fusarium wilt disease in tomato seedlings. *BMC Microbiol.* **2022**, *22*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kaur, S.; Samota, M.K.; Choudhary, M.; Pandey, A.K.; Sharma, A.; Thakur, J. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2022**, *28*, 485–504. [[CrossRef](#)]
29. Sallam, N.M.A.; Eraky, A.M.I.; Sallam, A. Effect of *Trichoderma* spp. on Fusarium wilt disease of tomato. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 4463–4470. [[CrossRef](#)]
30. Yuan, M.; Huang, Y.; Ge, W.; Jia, Z.; Song, S.; Zhang, L.; Huang, Y. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 144. [[CrossRef](#)]
31. Zhou, C.; Guo, R.; Ji, S.; Fan, H.; Wang, J.; Wang, Y.; Liu, Z. Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. *Microbiol. Res.* **2020**, *231*, 126371. [[CrossRef](#)]
32. Ben Amira, M.; Lopez, D.; Mohamed, A.T.; Khouaja, A.; Chaar, H.; Fumanal, B.; Gousset-Dupont, A.; Bonhomme, L.; Label, P.; Goupil, P.; et al. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biol. Control.* **2017**, *110*, 70–78. [[CrossRef](#)]
33. Kthiri, Z.; Ben Jabeur, M.; Machraoui, M.; Gargouri, S.; Hiba, K.; Hamada, W. Coating seeds with *Trichoderma* strains promotes plant growth and enhance the systemic resistance against *Fusarium* crown rot in durum wheat. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2020**, *30*, 139. [[CrossRef](#)]
34. Boamah, S.; Zhang, S.; Xu, B.; Li, T.; Calderón-Urrea, A. *Trichoderma longibrachiatum* (TG1) Enhances Wheat Seedlings Tolerance to Salt Stress and Resistance to *Fusarium pseudograminearum*. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kthiri, Z.; Ben Jabeur, M.; Harbaoui, K.; Karmous, C.; Chamekh, Z.; Chairi, F.; Serret, M.D.; Araus, J.L.; Hamada, W. Comparative Performances of Beneficial Microorganisms on the Induction of Durum Wheat Tolerance to Fusarium Head Blight. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bissett, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *J. Bot.* **1991**, *69*, 2357–2373. [[CrossRef](#)]
37. Chaverri, P.; Castlebury, L.A.; Samuels, G.J.; Geiser, D.M. Multilocus Phylogenetic Structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* Complex. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2002**, *27*, 302–313. [[CrossRef](#)]
38. Chaverri, P.; Branco-Rocha, F.; Jaklitsch, W.; Gazis, R.; Degenkolb, T.; Samuels, G.J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* **2015**, *107*, 558–590. [[CrossRef](#)]
39. Zadoks, J.C.; Chang, T.T.; Konzak, C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* **1974**, *14*, 415–421. [[CrossRef](#)]
40. Elad, Y.; Chet, I.; Henis, Y.A. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* **1981**, *9*, 59–67. [[CrossRef](#)]
41. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
42. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.J.; Taylor, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., White, T.J., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1990; pp. 315–322.
43. Carbone, I.; Kohn, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **1999**, *91*, 553–556. [[CrossRef](#)]
44. Jaklitsch, W.M.; Komon, M.; Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia* **2005**, *97*, 1365–1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Liu, Y.J.; Whelen, S.; Hall, B.D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 1799–1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Skidmore, A.M.; Dickinson, C.H. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria Nodorum* and phylloplane fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1976**, *66*, 57–64. [[CrossRef](#)]

47. Dennis, C.; Webster, J. Antagonistic properties of species-Groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1971**, *57*, 363–369. [CrossRef]
48. Mahfooz, M.; Dwedi, S.; Bhatt, A.; Raghuvanshi, S.; Bhatt, M.; Agrawal, P.K. Evaluation of Antifungal and Enzymatic Potential of Endophytic Fungi Isolated from *Cupressus torulosa* D. Don. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 4084–4100. [CrossRef]
49. Bhardwaj, A.; Sharma, D.; Jadon, N.; Agrawal, P.K. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Arch. Clin. Microbiol.* **2015**, *6*, 1.
50. López, A.C.; Alvarenga, A.E.; Zapata, P.D.; Luna, M.F.; Villalba, L.L. *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: Effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Mycology* **2019**, *10*, 210–221. [CrossRef]
51. Roberts, W.K.; Selitrennikoff, C.P. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *J. Fish Biol.* **1988**, *24*, 125–134. [CrossRef]
52. Coniglio, R.O.; Fonseca, M.I.; Villalba, L.L.; Zapata, P.D. Screening of new secretory cellulases from different supernatants of white rot fungi from Misiones, Argentina. *Mycology* **2017**, *8*, 1–10. [CrossRef]
53. Pikovskaya, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* **1948**, *17*, 362–370.
54. Gordon, S.A.; Weber, R.P. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* **1951**, *26*, 192–195. [CrossRef]
55. Noori, M.S.S.; Saud, H.M. Potential plant growth-promoting activity of *Pseudomonas* sp. isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *J. Plant Pathol. Microbiol.* **2012**, *3*, 121.
56. Castric, K.F.; Castric, P.A. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *45*, 700–702. [CrossRef] [PubMed]
57. Rakh, R.R.; Raut, L.S.; Dalvi, S.M.; Manwar, A.V. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas* cf. *monteilii* 9. *Recent Res. Sci. Technol.* **2011**, *3*, 26–34.
58. Cappuccino, J.C.; Sherman, N. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 4th ed.; Nitrogen Cycle; Benjamin/Cumming Pub. Co.: New York, NY, USA, 1992; pp. 311–312.
59. Rezgui, M.; Ben Mechlia, N.; Bizid, E.; Kalboussi, R.; Hayouni, R. Etude de La Stabilité du Rendement de Blé dur dans Différentes Régions de la Tunisie. In *L'Amélioration du Blé dur dans La Région Méditerranéenne: Nouveaux Défis. Options Méditerranéennes, Série A: Séminaires Méditerranéennes*; CIHEAM: Paris, France, 2000; Volume 40, pp. 167–172.
60. Fernandez, M.R.; Chen, Y. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Dis.* **2005**, *89*, 164–169. [CrossRef] [PubMed]
61. Triveni, S.; Prasanna, R.; Shukla, L.; Saxena, A.K. Evaluating the biochemical traits of novel *Trichoderma*-based biofilms for use as plant growth-promoting inoculants. *Ann. Microbiol.* **2012**, *63*, 1147–1156. [CrossRef]
62. Goulas, Y.; Cerovic, Z.G.; Cartelat, A.; Moya, I. Dualex: A new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Appl. Opt.* **2004**, *43*, 4488–4496. [CrossRef]
63. Amira, M.B.; Mom, R.; Lopez, D.; Chaar, H.; Khouaja, A.; Pujade-Renaud, V.; Fumanal, B.; Gousset-Dupont, A.; Bronner, G.; Label, P.; et al. MIP diversity from *Trichoderma*: Structural considerations and transcriptional modulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* olive trees. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193760.
64. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef]
65. Levene, H. Robust Tests for Equality of Variances. In *Contributions to Probability and Statistics*; Olkin, I., Ed.; Stanford University Press: Redwood, CA, USA; Palo Alto: Santa Clara, CA, USA, 1960; pp. 278–292.
66. Fox, J.; Weisberg, S. *An R Companion to Applied Regression*, 3rd ed.; Sage: Thousand Oaks, CA, USA, 2019. Available online: <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/> (accessed on 31 May 2023).
67. Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* **1965**, *52*, 591–611. [CrossRef]
68. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 31 May 2023).
69. Welch, B. On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach. *Biometrika* **1951**, *38*, 330–336. [CrossRef]
70. Games, P.A.; Keselman, H.J.; Clinch, J.J. Tests for Homogeneity of variance in factorial designs. *Psychol. Bull.* **1979**, *86*, 978–984. [CrossRef]
71. Kassambara, A. *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests*; R Package Version 0.7.1; R Project for Statistical Computing location: Vienna, Austria, 2022. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix> (accessed on 31 May 2023).
72. Carroll, R.M.; Nordholm, L.A. Sampling Characteristics of Kelley's epsilon and Hays' omega. *Educ. Psychol. Meas.* **1975**, *35*, 541–554. [CrossRef]
73. Field, F. *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics*; Sage Publications: New York, NY, USA, 2013.
74. Buchanan, E.M.; Gillenwaters, A.; Scofield, J.E.; Valentine, K. MOTE (Measure of the Effect): Package to assist in effect size calculations and their confidence intervals. 2019. Available online: <http://github.com/doomlab/MOTE> (accessed on 31 May 2023).
75. Kruskal, W.H.; Wallis, W.A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* **1952**, *47*, 583–621. [CrossRef]
76. Tomczak, M.; Tomczak, E. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. *Trends Sport Sci.* **2014**, *1*, 19–25.

77. Mangiafico, S. *Rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation*; R Package Version 2.4.18; R Project for Statistical Computing Location: Vienna, Austria, 2022. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion> (accessed on 31 May 2023).
78. Dunn, O.J. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* **1964**, *6*, 241–252. [CrossRef]
79. de Mendiburu, F. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*; R Package Version 1.3-5; R Project for Statistical Computing Location: Vienna, Austria, 2021. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae> (accessed on 31 May 2023).
80. Royston, P. An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples. *Appl. Stat.* **1982**, *31*, 115–124. [CrossRef]
81. Bartlett, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A* **1937**, *160*, 268–282.
82. Kassambara, A. *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*; R Package Version 0.6.0; R Project for Statistical Computing Location: Vienna, Austria, 2023. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr> (accessed on 31 May 2023).
83. Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.D.A.; François, R.; Golemund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J.; et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **2019**, *4*, 1686. [CrossRef]
84. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. Royal Statistical Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [CrossRef]
85. Samuels, G.J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* **2006**, *96*, 195–206. [CrossRef] [PubMed]
86. Feitosa, Y.B.; Cruz-Magalhães, V.; Argolo-Filho, R.C.; De Souza, J.T.; Loguercio, L.L. Characterization of genetic diversity on tropical *Trichoderma germplasm* by sequencing of rRNA internal transcribed spacers. *BMC Res. Notes* **2019**, *12*, 663. [CrossRef] [PubMed]
87. Raja, H.A.; Miller, A.N.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 756–770. [CrossRef] [PubMed]
88. Jaklitsch, W.M.; Voglmayr, H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Stud. Mycol.* **2015**, *80*, 1–87. [CrossRef]
89. Tekpinar, A.D.; Kalmer, A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwig.* **2019**, *109*, 187–224. [CrossRef]
90. Fanelli, F.; Liuzzi, V.C.; Logrieco, A.F.; Altomare, C. Genomic characterization of *Trichoderma atrobrunneum* (*T. harzianum* species complex) ITEM 908: Insight into the genetic endowment of a multi target biocontrol strain. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 662. [CrossRef]
91. Gu, X.; Wang, R.; Sun, Q.; Wu, B.; Sun, J.-Z. Four new species of *Trichoderma* in the Harzianum clade from northern China. *Mycoskeys* **2020**, *73*, 109–132. [CrossRef]
92. Gams, W.; Bisset, J. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy, and Genetics*; Kubicek, C.P., Harman, G.E., Ondik, K.L., Eds.; Taylor & Francis: London, UK, 2007; pp. 3–74.
93. Sadfi-Zouaoui, N.; Hannachi, I.; Rouaissi, M.; Hajlaoui, M.R.; Rubio, M.B.; Monte, E.; Boudabous, A.; Hermosa, M.R. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 154–162. [CrossRef]
94. Yangui, I.; Boutiti, Z.; Hlaïem, S.; Vettraino, A.M.; Vannini, A.; Ben Jamaà, M.L.; Messaoud, C. Identification and occurrence of *Trichoderma harzianum* associated with cork oak in Tunisia. *Tunis. J. Plant Prot.* **2018**, *13*, 39–48.
95. Daami-Rreamdi, M.; Hibar, K.; Jabnoun-Khiareddine, H.; Ayed, F.; El-Mahjoub, M. Effect of Two *Trichoderma* species on severity of potato tuber dry rot caused by Tunisian *Fusarium* complex. *Int. J. Agric. Res.* **2006**, *1*, 432–441.
96. Mbazia, A.; Omri Ben Youssef, N.; Kharrat, M. Tunisian isolates of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* can control *Botrytis fabae* on faba bean. *Biocontrol. Sci. Technol.* **2016**, *7*, 915–927. [CrossRef]
97. El-Sharkawy, H.H.; Rashad, Y.M.; Ibrahim, S.A. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2018**, *103*, 84–91. [CrossRef]
98. Stummer, B.E.; Zhang, Q.; Zhang, X.; Warren, R.A.; Harvey, P.R. Quantification of *Trichoderma afroharzianum*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma gamsii* inoculants in soil, the wheat rhizosphere and in planta suppression of the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 971–990. [CrossRef] [PubMed]
99. Junaid, J.M.; Dar, N.A.; Bhat, T.A.; Bhat, A.H.; Bhat, M.A. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *Int. J. Mod. Plant Anim. Sci.* **2013**, *1*, 39–57.
100. Harman, G.E.; Obregón, M.A.; Samuels, G.J.; Lorito, M. Changing models of biocontrol in the developing and developed world. *Plant Dis.* **2010**, *94*, 928–939. [CrossRef]
101. Stummer, B.E.; Zhang, X.; Yang, H.; Harvey, P.R. Co-inoculation of *Trichoderma gamsii* A5MH and *Trichoderma harzianum* Tr906 in wheat suppresses in planta abundance of the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* and impacts the rhizosphere soil fungal microbiome. *Biol. Control.* **2022**, *165*, 104809. [CrossRef]
102. Qiao, M.; Du, X.; Zhang, Z.; Xu, J.; Yu, Z. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. *Mycoskeys* **2018**, *44*, 63–80. [CrossRef]
103. Pfordt, A.; Schiwek, S.; Karlovsky, P.; Von Tiedemann, A. *Trichoderma Afroharzianum* Ear Rot—A New Disease on Maize in Europe. *Front. Agron.* **2020**, *2*, 547758. [CrossRef]
104. Cartelat, A.; Cerovic, Z.; Goulas, Y.; Meyer, S.; Lelarge, C.; Prioul, J.-L.; Barbottin, A.; Jeuffroy, M.-H.; Gate, P.; Agati, G.; et al. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crop. Res.* **2005**, *91*, 35–49. [CrossRef]

105. Liu, Y.; Wang, J.; Xiao, Y.; Shi, X.; Zeng, Y. Diversity Analysis of Chlorophyll, Flavonoid, Anthocyanin, and Nitrogen Balance Index of Tea Based on Dualex. *Phyton* **2021**, *90*, 1549–1558. [CrossRef]
106. Guler, N.S.; Pehlivan, N.; Karaoglu, S.A.; Guzel, S.; Bozdeveci, A. *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defense in maize seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **2016**, *38*, 19. [CrossRef]
107. Harman, G.E.; Doni, F.; Khadka, R.B.; Uphoff, N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *130*, 529–546. [CrossRef] [PubMed]
108. Lee, S.; Yap, M.; Behringer, G. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2016**, *3*, 7. [CrossRef] [PubMed]
109. Nieto-Jacobo, M.F.; Steyaert, J.M.; Salazar-Badillo, F.B.; Nguyen, D.V.; Rostás, M.; Braithwaite, M.; De Souza, J.T.; Jimenez-Bremont, J.F.; Ohkura, M.; Stewart, A.; et al. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 102. [CrossRef] [PubMed]
110. Yedidia, I.; Shosh, M. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of Phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 7343–7353. [CrossRef] [PubMed]
111. Jayapala, N.; Mallikarjunaiah, N.; Puttaswamy, H. *Rhizobacteria Bacillus* spp. induce resistance against anthracnose disease in chili (*Capsicum annuum* L.) through activating host defense response. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2019**, *29*, 45. [CrossRef]
112. Singh, S.P.; Keswani, C.; Singh, S.P.; Sansinenea, E.; Hoat, T.X. *Trichoderma* spp. mediated induction of systemic defense response in brinjal against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2021**, *24*, 100051.
113. Rawat, R.; Tewari, L. Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. *Curr. Microbiol.* **2011**, *62*, 1521–1526. [CrossRef]
114. Sawant, I.S.; Wadkar, P.N.; Ghule, S.B.; Salunkhe, V.P.; Chavan, V.; Sawant, S.D. Induction of systemic resistance in grapevines against powdery mildew by *Trichoderma asperelloides* strains. *Australas. Plant Pathol.* **2020**, *49*, 107–117. [CrossRef]
115. Marques, A.P.G.C.; Pires, C.; Moreira, H.; Rangel, A.O.; Castro, P.M. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* **2010**, *42*, 1229–1235. [CrossRef]
116. Marina, M.A.S.; Silva-Flores, M.A.; Uresti-Rivera, E.E.; Castro-Longoria, E.; Herrera-Estrella, A.; Casas-Flores, S. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *131*, 15–26. [CrossRef]
117. Kotasthane, A.; Agrawal, T.; Kushwah, R.; Rahatkar, O.V. In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter melon. *Eur. J. Plant Pathol.* **2015**, *141*, 523–543. [CrossRef]
118. Ng, L.C.; Ngadin, A.; Azhari, M. Potential of *Trichoderma* spp. as Biological Control Agents Against *Bakanae* Pathogen (*Fusarium fujikuroi*) in Rice. *Asian J. Plant Pathol.* **2015**, *9*, 46–58. [CrossRef]
119. Poonguzhali, S.; Madhaiyan, M.; Sa, T.M. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 773–777.
120. Majeed, A.; Abbasi, M.; Hameed, S. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 198. [CrossRef] [PubMed]
121. Patten, C.; Glick, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **1996**, *42*, 207–220. [CrossRef] [PubMed]
122. Gilbert, S.; Xu, J.; Acosta, K.; Poulev, A.; Lebeis, S.; Lam, E. Bacterial Production of Indole Related Compounds Reveals Their Role in Association Between Duckweeds and Endophytes. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 265. [CrossRef] [PubMed]
123. Contreras-Cornejo, H.A.; Macias-Rodriguez, L.; Cortes-Penagos, C. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1579–1592. [CrossRef]
124. Chowdappa, P.; Kumar, S.P.M.; Lakshmi, M.J.; Upreti, K.K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB. *Biol. Control* **2013**, *65*, 109–117. [CrossRef]
125. Zhao, L.; Zhang, Y. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. *J. Integr. Agric.* **2015**, *14*, 1588–1597. [CrossRef]
126. Perrig, D.; Boiero, M.L.; Masciarelli, O.A.; Penna, C.; Ruiz, O.A.; Cassán, F.D.; Luna, M.V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 1143–1150. [CrossRef] [PubMed]
127. Chiwocha, S.D.S.; Abrams, S.R.; Ambrose, S.J.; Cutler, A.J.; Loewen, M.; Ross, A.R.S.; Kermode, A.R. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: An analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* **2003**, *35*, 405–417. [CrossRef] [PubMed]
128. Goswami, D.; Thakker, J.N.; Dhandhukia, P.C. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *110*, 7–14. [CrossRef]
129. Spaepen, S.; Vanderleyden, J. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a001438. [CrossRef] [PubMed]



130. Yedidia, I.; Srivastva, A.K.; Kapulnik, Y. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* **2001**, *235*, 235–242. [[CrossRef](#)]
131. Fankem, H.; Nwaga, D.; Deubel, A.; Dieng, L.; Merbach, W.; Etoa, F.X. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, *5*, 2450–2460.
132. Ghosh, S.K.; Banerjee, S.; Pal, S. Encountering epidemic effects of leaf spot disease (*Alternaria brassicae*) on *Aloe vera* by fungal biocontrol agents in agri fields—An ecofriendly approach. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193720. [[CrossRef](#)]
133. El-Katatny, M.S. Inorganic phosphate solubilisation by free or immobilized *Trichoderma harzianum* cells in comparison with some other soil fungi. *Egypt. J. Biotechnol.* **2004**, *17*, 1338–1353.
134. Lalngaihawmi, A.; Bhattacharyya, A. Study on the Different Modes of Action of Potential *Trichoderma* spp. from Banana Rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2019**, *8*, 1028–1040.
135. Hassan, S.; Mathesius, U. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 3429–3444. [[CrossRef](#)]
136. Şesan, T.E.; Oancea, A.O.; Ştefan, L.M.; Mănoiu, V.S.; Ghiurea, M.; Răut, I.; Constantinescu-Aruxandei, D.; Toma, A.; Savin, S.; Bira, A.F.; et al. Effects of foliar treatment with a *Trichoderma* plant biostimulant consortium on *Passiflora caerulea* L. yield and quality. *Microorganisms* **2020**, *8*, 123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Harman, G.E.; Petzoldt, R.; Comis, A.; Chen, J. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **2004**, *94*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E.L.; Marra, R.; Woo, S.L.; Lorito, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 1–10. [[CrossRef](#)]
139. Garnica-Vergara, A.; Barrera-Ortiz, S.; Muñoz-Parra, E.; Raya-González, J.; Méndez-Bravo, A.; Macías-Rodríguez, L.; Ruiz-Herrera, L.F.; López-Bucio, J. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *N. Phytol.* **2016**, *209*, 1496–1512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Esparza-Reynoso, S.; Ruíz-Herrera, L.F.; Pelagio-Flores, R.; Macías-Rodríguez, L.I.; Martínez-Trujillo, M.; López-Coria, M.; Sánchez-Nieto, S.; Herrera-Estrella, A.; López-Bucio, J. *Trichoderma atroviride*-emitted volatiles improve growth of *Arabidopsis* seedlings through modulation of sucrose transport and metabolism. *Plant Cell Environ.* **2021**, *44*, 1961–1976. [[CrossRef](#)]
141. Wonglom, P.; Ito, S.; Sunpapao, A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal Ecol.* **2020**, *43*, 100867. [[CrossRef](#)]
142. Lemfack, M.C.; Gohlke, B.-O.; Toguem, S.M.T.; Preissner, S.; Piechulla, B.; Preissner, R. mVOC 2.0: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D1261–D1265. [[CrossRef](#)]
143. Guo, Y.; Jud, W.; Ghirardo, A.; Antritter, F.; Benz, J.P.; Schnitzler, J.; Rosenkranz, M. Sniffing fungi—Phenotyping of volatile chemical diversity in *Trichoderma* species. *N. Phytol.* **2020**, *227*, 244–259. [[CrossRef](#)]
144. Moya, P.; Girotti, J.R.; Toledo, A.V.; Sisterna, M.N. Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *J. Plant Prot. Res.* **2018**, *58*, 45–53.
145. Malinich, E.A.; Wang, K.; Mukherjee, P.K.; Kolomiets, M.; Kenerley, C.M. Differential expression analysis of *Trichoderma virens* RNA reveals a dynamic transcriptome during colonization of *Zea mays* roots. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 280. [[CrossRef](#)]
146. Zhang, Y.; Xiao, J.; Yang, K.; Wang, Y.; Tian, Y.; Liang, Z. Transcriptomic and metabolomic insights into the biocontrol mechanism of *Trichoderma asperellum* M45a against watermelon *Fusarium* wilt. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0272702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Zapparata, A.; Baroncelli, R.; Durling, M.B.; Kubicek, C.P.; Karlsson, M.; Vannacci, G.; Sarrocco, S. Fungal cross-talk: An integrated approach to study distance communication. *Fungal Genet. Biol.* **2021**, *148*, 103518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Seidl, V.; Marchetti, M.; Schandl, R.; Allmaier, G.; Kubicek, C.P. Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J.* **2006**, *273*, 4346–4359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Djonović, S.; Vargas, W.A.; Kolomiets, M.V.; Horndeski, M.; Wiest, A.; Kenerley, C.M. A Proteinaceous Elicitor Sm1 from the Beneficial Fungus *Trichoderma virens* Is Required for Induced Systemic Resistance in Maize. *Plant Physiol.* **2007**, *145*, 875–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Palmieri, M.C.; Perazzolli, M.; Matafora, V.; Moretto, M.; Bachi, A.; Pertot, I. Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 6237–6251. [[CrossRef](#)]
151. Gadaleta, A.; Colasuonno, P.; Giove, S.L.; Blanco, A.; Giancaspro, A. Map-based cloning of QFhb.mgb-2A identifies a WAK2 gene responsible for *Fusarium* Head Blight resistance in wheat. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6929. [[CrossRef](#)]
152. Chen, T.; Xiao, J.; Xu, J.; Wan, W.; Qin, B.; Cao, A.; Chen, W.; Xing, L.; Du, C.; Gao, X.; et al. Two members of TaRLK family confer powdery mildew resistance in common wheat. *BMC Plant Biol.* **2016**, *16*, 27. [[CrossRef](#)]
153. Dmochowska-Boguta, M.; Kloc, Y.; Zielezinski, A.; Werekci, P.; Nadolska-Orczyk, A.; Karlowski, W.M.; Orczyk, W. TaWAK6 encoding wall-associated kinase is involved in wheat resistance to leaf rust similar to adult plant resistance. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227713. [[CrossRef](#)]
154. Guo, F.; Wu, T.; Shen, F.; Xu, G.; Qi, H.; Zhang, Z. The cysteine-rich receptor-like kinase TaCRK3 contributes to defense against *Rhizoctonia cerealis* in wheat. *J. Exp. Bot.* **2021**, *72*, 6904–6919. [[CrossRef](#)]

155. Rubio, M.B.; de Alba, A.E.M.; Nicolás, C.; Monte, E.; Hermosa, R. Early Root Transcriptomic Changes in Wheat Seedlings Colonized by *Trichoderma harzianum* Under Different Inorganic Nitrogen Supplies. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2444. [CrossRef]
156. Bienert, G.P.; Chaumont, F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 1596–1604. [CrossRef] [PubMed]
157. Li, G.; Chen, T.; Zhang, Z.; Li, B.; Tian, S. Roles of Aquaporins in Plant-Pathogen Interaction. *Plants* **2020**, *9*, 1134. [CrossRef] [PubMed]
158. Safdarpour, F.; Khodakaramain, G. Endophytic bacteria suppress bacterial wilt of tomato. Caused by *Ralstonia solanacearum* and Activate defense-related metabolites. *Biol. J. Microorg.* **2018**, *6*, 39–52.
159. Almagro, L.; Gómez Ros, L.V.; Belchi-Navarro, S.; Bru, R.; Ros Barceló, A.; Pedreño, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 377–390. [CrossRef]
160. Ali, S.; Ganai, B.A.; Kamili, A.N.; Bhat, A.A.; Mir, Z.A.; Bhat, J.A.; Tyagi, A.; Islam, S.T.; Mushtaq, M.; Yadav, P.; et al. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* **2018**, *212–213*, 29–37. [CrossRef]
161. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *2*, 43–56. [CrossRef] [PubMed]
162. Shores, M.; Harman, G.E.; Mastouri, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2010**, *48*, 21–43. [CrossRef]
163. Gomes, E.V.; Ulhoa, C.J.; Cardoza, R.E.; Silva, R.N.; Gutiérrez, S. Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 Protein in the Regulation of Botrytis Virulence- and Tomato Defense-Related Genes. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 880. [CrossRef]
164. Pei, Y.; Li, X.; Zhu, Y.; Ge, X.; Sun, Y.; Liu, N.; Jia, Y.; Li, F.; Hou, Y. GhABP19, a Novel Germin-Like Protein From *Gossypium hirsutum*, Plays an Important Role in the Regulation of Resistance to Verticillium and Fusarium Wilt Pathogens. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 583. [CrossRef]
165. Mathys, J.; De Cremer, K.; Timmermans, P.; Van Kerckhove, S.; Lievens, B.; Vanhaecke, M.; Cammue, B.P.A.; De Coninck, B. Genome-Wide Characterization of ISR Induced in Arabidopsis thaliana by *Trichoderma hamatum* T382 Against Botrytis cinerea Infection. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 108. [CrossRef]
166. Rubio, M.B.; Quijada, N.M.; Pérez, E.; Domínguez, S.; Monte, E.; Hermosa, R. Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 1864–1873. [CrossRef]
167. Martínez, C.; Blanc, F.; Le Claire, E.; Besnard, O.; Nicole, M.; Baccou, J.-C. Salicylic Acid and Ethylene Pathways Are Differentially Activated in Melon Cotyledons by Active or Heat-Denatured Cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 334–344. [CrossRef] [PubMed]
168. Korolev, N.; David, D.R.; Elad, Y. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *BioControl* **2008**, *53*, 667–683. [CrossRef]
169. Medina, M.H.J.; Gagnon, H.; Piché, Y.; Ocampo, J.A.; Garcia, G.J.M.; Vierheilig, H. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Sci.* **2003**, *164*, 993–998. [CrossRef]
170. Alonso-Ramírez, A.; Poveda, J.; Martín, I.; Hermosa, R.; Monte, E.; Nicolás, C. Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol. Plant Pathol.* **2014**, *15*, 823–831. [CrossRef] [PubMed]
171. Peleg-Grossman, S.; Golani, Y.; Kaye, Y.; Melamed-Book, N.; Levine, A. NPR1 Protein Regulates Pathogenic and Symbiotic Interactions between Rhizobium and Legumes and Non-Legumes. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e8399. [CrossRef] [PubMed]
172. Lopez-Raez, J.A.; Verhage, A.; Fernandez, I.; Garcia, J.M.; Azcon-Aguilar, C.; Flors, V.; Pozo, M.J. Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 2589–2601. [CrossRef]
173. Viterbo, A.; Landau, U.; Kim, S.; Chernin, L.; Chet, I. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *305*, 42–48. [CrossRef]
174. Jaroszk-Ścisel, J.; Tyśkiewicz, R.; Nowak, A. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4923. [CrossRef]
175. Król, P.; Igielski, R.; Pollmann, S.; Kepczyńska, E. Priming of seeds with methyl jasmonate induced resistance to hemibiotroph *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato via 12-oxo-phytodienoic acid, salicylic acid, and flavonol accumulation. *J. Plant Physiol.* **2015**, *179*, 122–132. [CrossRef]
176. Sahu, R.; Sharaff, M.; Pradhan, M.; Sethi, A.; Bandyopadhyay, T.; Mishra, V.K.; Chand, R.; Chowdhury, A.K.; Joshi, A.K.; Pandey, S.P. Elucidation of defense-related signaling responses to spot blotch infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant J.* **2016**, *86*, 35–49. [CrossRef]
177. Singh, U.B.; Malviya, D.; Singh, S.; Kumar, M.; Sahu, P.K.; Singh, H.V.; Kumar, S.; Roy, M.; Imran, M.; Rai, J.P.; et al. *Trichoderma harzianum*- and Methyl Jasmonate-Induced Resistance to *Bipolaris sorokiniana* Through Enhanced Phenylpropanoid Activities in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1697. [CrossRef]
178. Kepczyńska, E.; Kepczyński, J. Inhibitory effect of methyl jasmonates on development of phytopathogen *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. and its reversal by ethephon and ACC. *Acta Physiol. Plant* **2005**, *27*, 491–496.
179. Kepczyńska, E.; Król, P. The phytohormone methyl jasmonate as an activator of induced resistance against the necrotroph *Alternaria porri* f.sp. *solani* in tomato plants. *J. Plant Interact.* **2012**, *7*, 307–315. [CrossRef]

180. Švecová, E.; Proietti, S.; Caruso, C.; Colla, G.; Crinò, P. Antifungal activity of Vitex agnus-castus extract against *Pythium ultimum* in tomato. *Crop. Prot.* **2013**, *43*, 223–230. [[CrossRef](#)]
181. Samolski, I.; Rincón, A.M.; Pinzón, L.M.; Viterbo, A.; Monte, E. The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* **2012**, *158*, 129–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Ruano-Rosa, D.; Prieto, P.; Rincón, A.M.; Gómez-Rodríguez, M.V.; Valderrama, R.; Barroso, J.B.; Mercado-Blanco, J. Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: Time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *Biocontrol* **2016**, *61*, 269–282. [[CrossRef](#)]
183. Basińska-Barczak, A.; Błaszczyk, L.; Szentner, K. Plant Cell Wall Changes in Common Wheat Roots as a Result of Their Interaction with Beneficial Fungi of *Trichoderma*. *Cells* **2020**, *9*, 2319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Ganuza, M.; Pastor, N.; Boccolini, M.; Erazo, J.; Palacios, S.; Oddino, C.; Reynoso, M.; Rovera, M.; Torres, A. Evaluating the impact of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 on indigenous microbial communities from field soils. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 608–623. [[CrossRef](#)]
185. Illescas, M.; Rubio, M.B.; Hernández-Ruiz, V.; Morán-Diez, M.E.; de Alba, A.E.M.; Nicolás, C.; Monte, E.; Hermosa, R. Effect of Inorganic N Top Dressing and *Trichoderma harzianum* Seed-Inoculation on Crop Yield and the Shaping of Root Microbial Communities of Wheat Plants Cultivated Under High Basal N Fertilization. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 575861. [[CrossRef](#)]
186. Friedl, M.A.; Druzhinina, I.S. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology* **2012**, *158*, 69–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Singh, A.; Lasek-Nesselquist, E.; Chaturvedi, V.; Chaturvedi, S. *Trichoderma polysporum* selectively inhibits white nose syndrome fungal pathogen *Pseudogymnoascus destructans* amidst soil microbes. *Microbiome* **2018**, *6*, 319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Martínez-Medina, A.; Fernández, I.; Sánchez-Guzmán, M.J.; Jung, S.C.; Pascual, J.A.; Pozo, M.J. Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 206. [[CrossRef](#)]
189. Leonetti, P.; Zonno, M.C.; Molinari, S.; Altomare, C. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Rep.* **2017**, *36*, 621–631. [[CrossRef](#)]
190. Van Wees, S.C.; De Swart, E.A.; Van Pelt, J.A.; Van Loon, L.C.; Pieterse, C.M. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8711–8716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Mur, L.A.; Kenton, P.; Atzorn, R.; Miersch, O.; Wasternack, C. The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 249–262. [[CrossRef](#)]
192. Illescas, M.; Pedrero-Méndez, A.; Pitorini-Bovolini, M.; Hermosa, R.; Monte, E. Phytohormone Production Profiles in *Trichoderma* Species and Their Relationship to Wheat Plant Responses to Water Stress. *Pathogens* **2021**, *10*, 991. [[CrossRef](#)]
193. Alfano, G.; Ivey, M.L.L.; Cakir, C.; Bos, J.I.B.; Miller, S.A.; Ma, S.; Kamoun, S.; Hoitink, H.A.J.; Alfano, M.L.L.I.G.; Uddin, M.N.; et al. Systemic Modulation of Gene Expression in Tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* **2007**, *97*, 429–437. [[CrossRef](#)]
194. Segarra, G.; Jáuregui, O.; Casanova, E.; Trillas, I. Simultaneous quantitative LC–ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 395–401. [[CrossRef](#)]
195. Attaran, E.; Major, I.T.; Cruz, J.A.; Rosa, B.A.; Koo, A.; Chen, J.; Kramer, D.; He, S.Y.; Howe, G.A. Temporal Dynamics of Growth and Photosynthesis Suppression in Response to Jasmonate Signaling. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 1302–1314. [[CrossRef](#)]
196. Huot, B.; Yao, J.; Montgomery, B.L.; He, S.Y. Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol. Plant* **2014**, *7*, 1267–1287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## ***Axe de recherche 3***

***« Rhizobacteria »***

***Evaluation of Tunisian wheat endophytes as  
plant growth promoting bacteria and  
biological control agents against *Fusarium  
culmorum****

## Préambule

Depuis la révolution verte et au fil des ans, la production agricole des petits exploitants a régulièrement diminué en raison de la baisse de la fertilité des sols, du changement des conditions climatiques, de l'indisponibilité de terres arables et de la dépendance excessive à l'égard de l'eau de pluie pour l'agriculture (Vanlauwe et al., 2014). Cette baisse de la productivité des cultures est notamment aggravée par la dégradation des terres agricoles causée par certaines pratiques culturales telles que l'utilisation excessive d'engrais et de pesticides inorganiques, l'épuisement des matières organiques du sol lié à la monoculture de plantes exigeantes comme les céréales, et l'émergence de phytopathogènes destructeurs ont également contribué à la baisse de la productivité des cultures (Kopittke et al., 2019 ; Singh et al., 2020).

Par ailleurs, l'ensemble de ces pratiques culturales dites modernes a ruiné significativement l'écologie des sols. Elle se caractérise par de nombreuses interactions clés et remarquablement complexes entre les plantes et les microbes. Parce qu'elles sont profondément perturbées et leur bénéfice aujourd'hui reconnu, la restauration écologique de la fertilité des sols est à ce jour indispensable (Altieri et al., 2018). L'utilisation d'agents biologiques bénéfiques et/ou de leurs dérivés dans l'agriculture durable gagne en popularité grâce aux progrès récents de la technologie moléculaire. En effet, outre leurs actions positives sur les plantes et les écosystèmes microbiens contigus, ces agents biologiques sont respectueux de l'environnement, polyvalents, et peuvent améliorer la productivité des cultures dans un large éventail d'environnements soumis à une continue évolution des conditions climatiques (Kumar et al., 2017).

Les composants microbiens de l'endosphère et de la rhizosphère des plantes forment des associations bénéfiques complémentaires avec les plantes, améliorant ainsi la physiologie générale de celles-ci et, *in fine*, la productivité des cultures (Ali et al., 2017). Ces organismes favorisent également les résistances locale et systémique des plantes à divers facteurs abiotiques (sécheresse, salinité, chaleur, carences minérales, pollution, etc.) et biotiques contre un large spectre d'agents phytopathogènes et de ravageurs ; des événements contraignant qui impactent significativement la croissance végétale et ses potentiels de production (Kumar et Verma, 2018). Ces potentialités bénéfiques sont liées à de nombreux mécanismes moléculaires, souvent spécifiques des espèces de micro-organismes engagés, comme notamment l'augmentation de la fixation biologique de l'azote et de l'assimilation du carbone, la sécrétion d'hormones de croissance (auxines, cytokinines et gibbérellines), la sécrétion d'enzymes extracellulaires lytiques, la solubilisation, l'absorption et l'assimilation des nutriments (solubilisation du phosphate et du zinc notamment, production d'ammoniac, de cyanure d'hydrogène et de sidérophores), et la production d'acides organiques, de biosurfactants, de métabolites toxiques ou antibiotiques, d'oxyde nitrique et d'osmolytes (Pii et al., 2018).

Les endophytes sont omniprésents chez le monde végétal. Bien que des spécificités de présence sur certains organes aient été observées, ils sont systématiquement associés à la quasi-totalité des plantes examinées jusqu'à présent. Les endophytes bénéfiques se trouvent principalement au niveau des racines, mais ils colonisent également la phyllosphère et les graines et fruits.

Parmi les bactéries rhizosphériques, certaines espèces peuvent vivre à l'extérieur, ou en contact direct avec les tissus de la plante hôte. Pour cette dernière situation, sont nuancées les bactéries rhizosphériques de type épiphytes dont leur habitat correspond à la surface des organes végétaux, et les endophytes bactériens qui présentent l'aptitude de pénétrer à l'intérieur de leur hôte sans causer de dommages physiologiques ou morbides (Schulz et Boyle, 2006 ; Ryan et al., 2008). Elles sont dénommées sous le sigle général "PGPE" ("*Plant Growth Promoting Endophytes*"). Elles vivent dans les espaces intercellulaires et se nourrissent de "nutriments apoplasmiques" (Rosenblueth et al., 2006 ; Marella, 2011). Quelle que soit la proximité de l'interaction PGP-plante, ces bactéries établissent des relations complexes avec les plantes hôtes. Elles agissent comme des promoteurs des fonctions physiologiques liées à la croissance et à l'immunité de leurs hôtes, voire en prenant comme "cible trophique" les agents pathogènes ou agresseurs. Ces agents sont également qualifiés d'agents de biocontrôle. Le rôle des bactéries associées aux plantes dans l'amélioration de la production agricole et de la fertilité des sols est donc très étudié. Parmi une diversité de rhizobactéries remarquables, plusieurs genres de bactéries sont utilisés comme PGPR, et comprennent notamment les genres *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, et *Serratia* (Verma et al., 2019). La diversité très riche des espèces endophytes observée recouvrirait l'activité des populations constituées d'espèces « neutres », commensales, mais également d'espèces phytopathogènes "latentes" et dont les agressivités seraient alors contenues. Il s'avère que la diversité des espèces constituant une communauté, quel que soit l'organe, est aujourd'hui relativement aisée à inventorier. *A contrario*, les facteurs qui affectent la composition des espèces au sein des communautés microbiennes ainsi que les relations qui les unissent spatio-temporellement à une espèce végétale donnée sont loin d'être entièrement compris. Ces facteurs seraient déterminés par le génotype de l'hôte, l'âge de la plante, le type de tissu, la localité géographique et la saisonnalité par exemple (Porras-Alfaro et Bayman, 2011).

En ce qui concerne les endophytes bactériens précisément, la population de micro-organismes que nous avons étudiée spécifiquement dans ce présent chapitre, ils peuvent être isolés à l'intérieur d'un matériel végétal ayant été au préalable soigneusement stérilisé en surface (Liu et al., 2017). Ces bactéries ont des capacités d'adaptation particulières qui leur permettent d'envahir et de coloniser leur hôte. Leur présence engendre pour la plante deux influences positives, une amélioration de la croissance en établissant des interactions synergiques particulières avec la plante hôte, et une protection immune de l'hôte au travers d'interactions antagonistes directes et indirectes avec les pathogènes du sol (Eljounaidi et al., 2016). Par ailleurs, ces endophytes bactériens seraient soumis à une sélection évolutive plus longue sur de nombreuses générations. Ils sont donc considérés comme ayant une relation plus étroite avec l'hôte et, à ce titre, ils établiraient une niche écologique plus durable que les rhizobactéries libres du sol (Moronta-Barrios et al., 2018 ; Abedinzadeh et al., 2019). De même, le fait qu'ils soient très bien adaptés à leur partenaire hôte (Griffiths et al., 2020), voire "choisis" par celui-ci au vu des avantages qu'ils fournissent (Ullah et al., 2019), ces endophytes seraient héréditaires entre générations (Hardoim et al., 2008).

Leur transmissibilité intergénérationnelle serait assurée *via* les semences (Hardoim et al., 2008). Toutes ces aptitudes les rendraient plus "compatibles" avec leur hôte, créant une interaction privilégiée et stimulatrice de la croissance et de la résistance des plantes. A cet égard, les endophytes bactériens exerceraient potentiellement des effets bénéfiques plus importants sur les plantes hôtes que d'autres bactéries associées aux plantes.

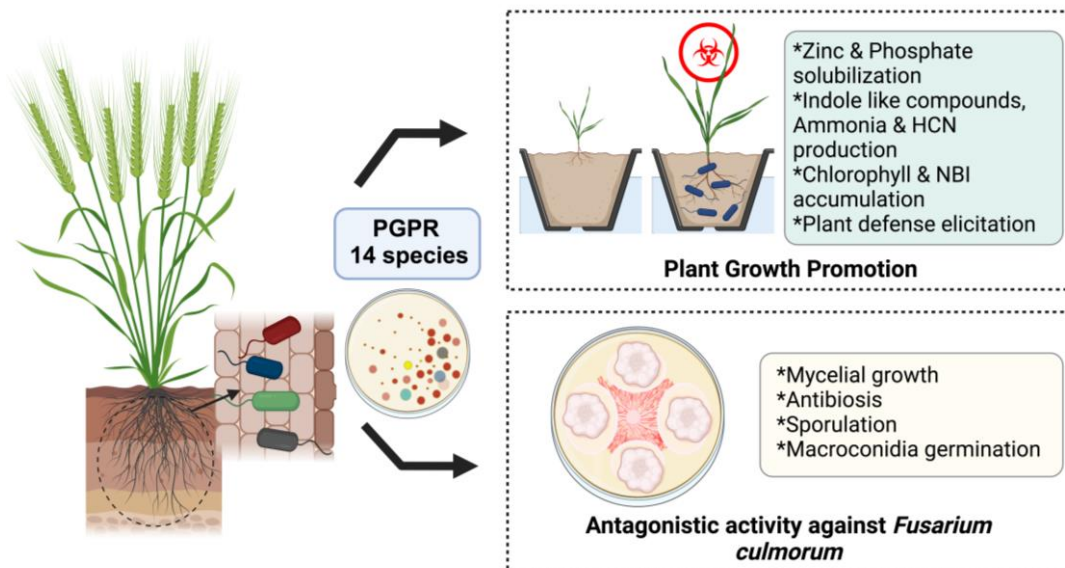
Il est unanimement reconnu que les interactions multilatérales inter-microbes/plantes jouent un rôle écologique fondamental dans la qualité biologique des sols. Tirer bénéfice de ces interactions et les valoriser de manière appropriée et ambitieuse serait alors un levier pertinent dans la restauration des terres dégradées afin de sauvegarder durablement un paysage agricole productif et sain. Les facteurs mentionnés préalablement (*ie* stabilité/durabilité dynamique dans le temps, complémentarité moléculaire inter-organismes et héritabilité intergénérationnelle) conditionnent l'installation optimale des endophytes dans un micro-système biotique limité (la plante hôte) évoluant dans des environnements abiotiques et biotiques ouverts et perpétuellement fluctuants. Rechercher ces endophytes bactériens, ainsi que comprendre le plus exhaustivement possible leur fonctionnement tant vis-à-vis de leur plante hôte que des autres micro-organismes coévoluant dans une niche commune, apparaissent des actions de recherche primordiales pour réfléchir à la sélection d'endophytes adaptatifs et efficaces associés à une plante particulière et d'importance agricole, comme le blé. Plus important encore, ces actions de recherche sur les endophytes intègrent pleinement les objectifs généraux des programmes de sélection végétale dont les ambitions affichées doivent répondre urgemment à des préoccupations majeures comme l'adaptation des plantes au changement climatique, la transition agroécologique et l'évolution des modes de consommation d'une Humanité en pleine explosion démographique. Ces enjeux sont certes systémiques, mais concernent également la Tunisie où la production de blé est une priorité en raison de son importance dans l'alimentation (Rastoin et Benabdrazik, 2014).

En dépit des profondes méconnaissances sur le fonctionnement de ces communautés endophytes entre elles et avec leur partenaire hôte, les endophytes bénéfiques associés aux céréales gagnent en popularité en raison de leur impact positif sur la croissance des plants et le rendement des cultures, en particulier vis-à-vis du blé dans des conditions environnementales fluctuantes et défavorables (Zhang et al., 2017).

Afin de répondre aux préoccupations environnementales et de santé publique développées dans le chapitre précédent, il apparaît nécessaire d'augmenter la production de blé de façon durable tout en atténuant les problèmes écologiques causés par l'utilisation excessive de produits agrochimiques. Le recours à l'utilisation d'endophytes bénéfiques et locaux en tant que produits agrobiochimiques (*ie* biofertilisants et biopesticides) serait une alternative très encourageante pour soutenir une production durable à très faible impact écologique. Par ailleurs, l'utilisation des PGPR présenterait de nombreux autres avantages comme leur faible coût de fabrication et leur facilité d'application en champs (Zaidi et al., 2015).

Dans ce troisième axe de recherche, nous avons souhaité valoriser l'isolement des micro-organismes bactériens endophytes qui colonisent naturellement les racines de l'ancienne variété de blé tendre, *Florence Aurore*. L'objectif de cet axe a été d'identifier au sein de ces communautés bactériennes des espèces qui développent des actions biostimulatrices sur la croissance et l'immunité innée des plants d'une part, et leur aptitude à produire des molécules toxiques inhibitrices de la germination des spores et/ou du développement mycélien de l'agent phytopathogène *F. culmorum*, d'autre part. Notre objectif finalisé est que certains des agents biologiques isolés puissent être intégrés ensemble dans les programmes de lutte biologique (contraintes biotiques et abiotiques) sur les variétés de blé moderne en Tunisie, et ce afin de réduire au maximum l'emploi des produits chimiques (engrais et pesticides) dans la production de blé.

A l'instar de l'axe de recherche qui ciblait le genre *Trichoderma*, l'ensemble des résultats générés dans cet axe de recherche sont intégralement exposés dans le projet d'article qui suit et qui est soumis dans la revue internationale PLoS One®.



### Résumé graphique de l'article « Evaluation of Tunisian wheat endophytes as plant growth promoting bacteria and biological control agents against *Fusarium culmorum* »

(Source personnelle, réalisé avec BioRender). Ce graphique illustre l'effet des 14 endophytes racinaires sur la stimulation de la croissance, l'expression des défenses végétales et l'inhibition de *Fusarium culmorum*.



## RESEARCH ARTICLE

### **Evaluation of Tunisian wheat endophytes as plant growth promoting bacteria and biological control agents against *Fusarium culmorum***

Mouadh Saadaoui<sup>1,2,3</sup>, Mohamed Faize<sup>4</sup>, Aicha Rifai<sup>4</sup>, Koussa Tayeb<sup>4</sup>, Noura Omri Benyoussef<sup>3,5</sup>, Mohamed Kharrat<sup>3</sup>, Patricia Roeckel-Drevet<sup>1</sup>, Hatem Char<sup>3,5</sup>, Jean-Stéphane Venisse<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, INRAE, PIAF, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> Université de Tunis El Manar, Campus Universitaire Farhat Hached, B.P. n° 94 - ROMMANA, Tunis 1068, Tunisie

<sup>3</sup> Field Crops Laboratory, National Institute for Agricultural Research of Tunisia (INRAT), Hedi Karray Street, 1004, El Menzah, Ariana, Tunisia

<sup>4</sup> Laboratory of Plant Biotechnology, Ecology and Ecosystem Valorization, Faculty of Sciences, University Chouaib Doukkali, El Jadida 24000, Morocco

<sup>5</sup> National Institute of Agronomy of Tunisia (INAT)

\* Corresponding author

[j-stephane.venisse@uca.fr](mailto:j-stephane.venisse@uca.fr) (JSV)

## Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) applications have emerged as an ideal substitute for synthetic chemicals by their ability to improve plant nutrition and resistance against pathogens. In this study, we isolated fourteen root endophytes from healthy wheat roots cultivated in Tunisia. The isolates were identified based from their *16S rRNA* gene sequences. They belonged to *Bacillota* and *Pseudomonadota* taxa. Fourteen strains were tested for their growth-promoting and defense-eliciting potentials on durum wheat under greenhouse conditions, and for their *in vitro* biocontrol power against *Fusarium culmorum*, an ascomycete responsible for seedling blight, foot and root rot, and head blight diseases of wheat. We found that all the strains improved shoot and/or root biomass accumulation, with *Bacillus mojavensis*, *Paenibacillus peoriae* and *Variovorax paradoxus* showing the strongest promoting effects. These physiological effects were correlated with the plant growth-promoting traits of the bacterial endophytes, which produced indole-related compounds, ammonia, and HCN, and solubilized phosphate and zinc. Likewise, plant defense accumulations were modulated lastingly and systematically in roots and leaves by all the strains. Testing *in vitro* antagonism against *F. culmorum* revealed an inhibition activity exceeding 40% for five strains: *Bacillus cereus*, *Paenibacillus peoriae*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pantoea agglomerans*, and *Pseudomonas aeruginosa*. These strains exhibited significant inhibitory effects on *F. culmorum* mycelia growth, sporulation, and/or macroconidia germination. *P. peoriae* performed best, with total inhibition of sporulation and macroconidia germination. These finding highlight the effectiveness of root bacterial endophytes in promoting plant growth and resistance, and in controlling phytopathogens such as *F. culmorum*. This is the first report identifying 14 bacterial candidates as potential agents for the control of *F. culmorum*, of which *Paenibacillus peoriae* and/or its intracellular metabolites have potential for development as biopesticides.

## Introduction

Plants in nature undergo a wide range of biotic and abiotic stresses. To resist these threats, they have developed strategies to form alliances with beneficial plant-associated microbes through a signaling network mediated by phytohormones and a plethora of secondary metabolites [1,2]. Beneficial microorganisms (fungi or bacteria) can be epiphytic, colonizing the surface of plant organs, or endophytic, living in the intercellular spaces and feeding on apoplastic nutrients without causing any apparent disease symptoms [3,4].

The relationship between endophytes and their host may be neutral or even pathogenic (latent pathogens), but a subset of them has been found to develop beneficial behavior, conferring several physiological advantages on their host, and prompting better plant resilience. The positive effect of endophytes can be explained by several direct and indirect mechanisms. They include the production of plant growth regulators or phytohormones (auxins, cytokinins and gibberellins), improved biological nitrogen fixation and nutrient mobilization and assimilation (phosphorus, zinc, etc.), and the potentiation of tolerance to abiotic stress (salinity, drought, pollution), and biotic stress by stimulating the host to deploy specific defensive weapons locally and systemically. Endophytes may compete with pathogens either by physically interacting with them to become their prey (parasitic activities), or indirectly by colonizing infection sites and appropriating common nutrients, including the synthesis of substances with bactericidal action (HCN, “antibiotic” compounds, siderophores, etc.) or by inducing the accumulation of plant defenses (innate immunity) [5-7]. These capacities derive from the delivery or regulation of various complex and interconnected hormone signaling-dependent pathways, involved in growth (e.g., IAA, abscisic acid, gibberellic acid, and cytokinins) and plant defenses (e.g., salicylates, jasmonates, and ethylene) [8].

Endophytes are ubiquitous and have been associated with almost all plants examined [9]. Beneficial endophytes are mostly found in the rhizosphere, but they also colonize the phyllosphere, and a few are obligate symbionts transmitted to seeds [10]. The endophytic communities and the networks that drive them are thus remarkably diverse and complex. Factors affecting the composition of species inside microbial communities are far from fully understood [11]. However, beneficial endophytes associated with cereals have drawn interest because of their positive impact on crop growth and yield [12]. Their use is particularly relevant -if not urgent- for wheat (*Triticum aestivum* L.), one of the most important staple crops in the world, which is directly and profoundly affected by changing environmental conditions. The need to increase wheat production and the ecological damage caused by the excessive use of agrochemicals make endophytes an attractive alternative for sustainable production with low environmental impacts.

In Tunisia, durum wheat is a strategic crop because of its importance in traditional diet [13]. The cultivation of wheat started with *Florence Aurore*, a non-bearded soft wheat variety, which covered up to 80% of the Tunisian bread wheat surface until 1952. It has since been replaced by modern higher yield varieties [14,15]. Unfortunately, varietal selection has adversely affected the ability of these modern varieties to interact with native microbes, limiting the beneficial input from plant-microbe interactions, as reported by Valente et al [16].

*Fusarium* species are the most destructive wheat pathogens and toxin-producing fungi, causing extensive damage and significant yield losses [17]. In Tunisia, *Fusarium culmorum* is one of the dominant wheat pathogens [18]. It is the causal agent of seedling, foot and root rot, and head blight (FSB, FFRR and FHB) on various small grain cereals, in particular wheat and barley [19]. The ability of *F. culmorum* to persist in the soil as chlamydospores for many years, the lack of fully resistant wheat cultivars and the fact that Tunisia is considered a climate change hotspot make this fungal agent difficult to manage [20,21]. Fungicides are the most effective tools to control diseases caused by *F. culmorum*. However, given their negative impacts on the environment and human health, and the increased resistance of pathogens to them, it is crucially urgent to find new safe alternatives [22].

Increasing agricultural productivity, particularly wheat production, in a sustainable and environment-friendly way is a major challenge. The use of PGPR, thanks to their ability to improve plant growth, productivity, and innate immunity, should help accomplish this aim. However, as awareness of environmentally friendly farming practices grows through the strict adoption of precautionary procedures with alternative biological controls, it is essential to find region-specific microbial strains that can be used as growth-promoting inocula to achieve desired crop production [23]. This means that specific selection of PGPR strains is necessary, according to the agronomic objectives pursued and the geographical areas assigned for their use. In this regard, the characterization of native PGPRs from agroclimatic areas where severe *F. culmorum* infestation occurs, and their valorization as biofertilizers and biopesticides against this fungal agent in its originating area and surroundings, are of great interest. This research focuses on bacterial endophytes colonizing the roots of an old bread wheat variety (*Florence Aurore*) cultivated in an organic farming system in Tunisia. The study had three main objectives: (i) verify the presence of beneficial bacterial root endophytes in this wheat variety through isolation and molecular identification, (ii) evaluate their ability to promote plant growth in a controlled chamber, measuring their capacity to produce indole-related compounds, HCN, and ammonia, and to solubilize phosphate and zinc elements, and (iii) characterize their ability *in vitro* to elicit plant defenses and act as a direct biocontrol agent against *F. culmorum*, particularly by inhibiting sporulation and macroconidia germination, given the importance of spores in the *Fusarium* life cycle and disease dissemination.

## Materials and Methods

### Study site and sample collection

The study site was located in Gosset El Bey Bizerte, about 60 km north-west of Tunis (36°92'40.96"N, 9°69'90.89"E, 133 m a.s.l.). The topography is mainly hilly with stretches of plains. The climate is warm Mediterranean with dry summers. The annual temperature range is approx. 18.2°C, the average rainfall approx. 582.7 mm. Field sampling was conducted in May 2020. Healthy plant samples of wheat (*Triticum aestivum* L.) variety *Florence Aurore* were collected randomly from an organic crop field at grain-filling stage (Growth stage 87, according to the code defined by Zadoks et al [24]. Samples were placed individually in plastic bags and brought to the Tunisian National Institute of Agronomic Research (INRAT) for bacteria isolation.

### Isolation of root endophytic bacteria

Plants were carefully removed from rhizospheric soil and washed with tap water. Roots were cut into sections 2-3 cm long and dried on filter paper. All root segments were surface-sterilized to remove epiphytic microbes by dipping them in 70% ethanol for 2 min, in 0.5% NaOCl for 2 min, in 70% ethanol for 1 min, and then washing them three times with sterile distilled water. Fragments were placed in tryptone soya agar (TSA). Bacteria were also isolated by serial dilution plating of sterilized crushed root samples on TSA plates as described by Hameed et al [25]. Plates were incubated at 28±2°C and inspected daily until bacteria appeared. The surface sterilization technique was checked by inoculating TSA plates with 1 mL of the wash water. Absence of microbial growth was taken as evidence of successful surface sterilization. Isolates were picked and transferred onto agar-solidified lysogeny broth (LB) medium for further purification. The morphological aspect of the 14 strains used in this work is shown in **S1 Figure**.

### DNA extraction, 16S rRNA gene sequencing, and phylogenetic analysis

Total genomic DNA was extracted from bacteria using the phenol-chloroform method. A partial region of 16S rRNA gene was amplified using 27/1492R primers [26]. PCR amplifications were performed using a BioRad thermal cycler with initial denaturing at 95°C (2 min), followed by denaturing for 35 cycles of 95°C for 30 s, primer annealing at 58°C for 30 s, primer extension at 72°C for 45 s, and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR reactions were run in a total volume set at 50 µL, the mix containing 1 µL of genomic DNA (25 ng µL<sup>-1</sup>), 10 µL of colorless GoTaq Flexi Buffer (5X), 3 µL of MgCl<sub>2</sub> solution (25 mM), 1 µL of PCR nucleotide mix (10 mM each dNTP), 1 µL of primers (5 µM each), 0.25 µL of GoTaq (G2 Flexi DNA Polymerase 5 u µL<sup>-1</sup>), and 32.75 µL of sterile water. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1.5%) and sequenced by Genewiz company (Germany). 16S rRNA gene sequences of each isolate were identified by BLAST alignment inferred in the public database NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), and recorded in the NCBI GenBank database. Related accession numbers are listed in **Fig 1a**. Homologous 16S rRNA gene sequences used in the study were retrieved from the NCBI BLAST analyses. Multiple DNA sequence alignments were performed using the Clustal-W algorithm. Maximum likelihood analysis was used to construct a phylogenetic tree as implemented in the

PhyML program, with bootstrap analysis based on 1000 random resamplings. Nucleotide sequence accession numbers are listed in **Fig 1a**.

## **Extracellular enzyme production**

### **Catalase**

A small quantity of fresh bacterial culture was taken from an LB plate using a sterilized wooden pin and placed on a glass slide. A drop of hydrogen peroxide (3%) was added to the samples. Immediate bubbling showed catalase production [27].

### **Amylase**

Overnight-grown bacterial cultures were used for spot inoculation on mineral starch medium agar containing ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,  $\text{MgSO}_4$  0.2, starch 5, agar 20 (pH 8.0) [28]. For each strain, four spots per plate were run (each spot 10  $\mu\text{L}$ ). After 48 h of incubation at 28°C, the plates were flooded with an aqueous solution of iodine 1% (w/v) in potassium iodide 2% (w/v) to reveal the clear zone of degradation around colonies producing amylase.

### **Protease**

LBA medium supplemented with 1% skim milk was used to detect protease activity [29]. Fresh bacterial cultures were spot-inoculated and plates were incubated at 28°C for 3-4 days. The presence of halo zones around the bacterial growth was considered as a positive result for protease production.

### **Cellulase**

Cellulase activity was tested by spot inoculation on M9 minimal salt medium comprising ( $\text{g L}^{-1}$ )  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  33.9,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15,  $\text{NaCl}$  2.5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5, yeast extract 1.2, and agar 15 amended with 1% carboxymethyl cellulose [30]. Plates were left at 28°C for 7 days, then flooded with an aqueous solution of iodine 1% (w/v) in potassium iodide 2% (w/v). The presence of a clear zone around the colonies was considered as a positive result for cellulase production.

## ***In vitro* determination of plant growth promotion activities**

### **Production of indole-related compounds**

Overnight-grown cultures of the bacterial isolates were inoculated in LB broth supplemented with 0.1% of *L*-tryptophan. After 48 h of growth at 28°C under constant shaking (240 rpm), 1 mL of supernatant was collected from each culture after 5 min of centrifugation at 14,000 rpm, and mixed with 2 mL of Salkowski's reagent ( $\text{FeCl}_3$  0.5 M, and 35%  $\text{HClO}_4$ ). Samples were incubated at room temperature for 30 min and the intensity of color was measured by spectrophotometry at 535 nm. This assay was carried out in triplicate. Non-inoculated LB broth (with *L*-tryptophan) was used as control. A standard curve with pure IAA was generated to estimate the amount of produced indole-related compounds, produced by suspending IAA (Sigma) in 100% ethanol at a concentration of 10  $\text{mg mL}^{-1}$  and diluting it in LB medium to a concentration of 10 – 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Control was sterile LB medium with and without *L*-tryptophan [31,32].

## **Phosphate solubilization**

Inorganic phosphate solubilization ability was detected by spot inoculating isolates on Pikovskaya's agar medium (PVK) amended with 0.5% (w/v)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , consisting of ( $\text{g L}^{-1}$ ) glucose 10, yeast extract 0.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1, KCl 0.2, and agar 15 (pH 7) [33]. Plates were incubated at 28°C for 5-7 days. The formation of a clear zone around the colonies indicated the solubilization of phosphate by the isolates.

## **Ammonia production**

Ammonia was estimated by growing bacterial strains in peptone water for 72 h at 28°C. Cultures were centrifuged for 5 min at 14,000 rpm, and to 1 mL of each culture supernatant 50  $\mu\text{L}$  of Nessler's reagent was added (KI 7%, HgI<sub>2</sub> 10%, 50% aqueous solution of NaOH 32%) [34]. The formation of a slight yellow to brownish color is an indicator of ammonia production. The optical density of each strain was measured at 450 nm to quantify the amount of ammonia produced using a standard curve of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution at the following concentrations: 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, and 4  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ .

## **Zinc solubilization**

Bacterial strains were screened for their zinc solubilization potential on Tris-minimal medium containing ( $\text{g L}^{-1}$ ) *D*-glucose 10, Tris-HCl 6.06, NaCl 4.68, KCl 1.49;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.07,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.43,  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03, agar 15 (pH 7), amended with 0.1% zinc oxide according to Fasim et al [35]. Plates were incubated for 14 days in the dark at 28°C. Zinc-solubilizing strains produced halo zones around colonies. The surface of these zones was measured using ImageJ software to calculate the Zn solubilization efficiency (SE) % according to Sharma et al [36] using the following modified equation: Zn solubilization efficiency SE (%) = (surface of solubilization halo / surface of colony) x 100.

## **Production of hydrogen cyanide**

HCN production was assessed by cultivating bacterial colonies on LB medium supplemented with 4.4  $\text{g L}^{-1}$  of *L*-glycine [37]. Sterilized filter papers were soaked in alkaline picrate solution (0.25% picric acid and 1.25% sodium carbonate) for one minute, placed on the cover of Petri plates, and sealed with Parafilm. After 4-5 days of incubation at 28°C, color change of the filter paper from yellow to brick red indicates the production of HCN. This assay was repeated four times.

## ***In vitro* biocontrol activity**

### ***In vitro* dual-culture analysis**

Antifungal activity of bacterial isolates against *Fusarium culmorum* was assessed by dual culture assays as described by Al-Mutar et al [38]. Four sterile filter paper discs (diameter 5 mm) were soaked on overnight-grown bacterial culture and placed symmetrically around a 5 mm diameter agar plug of *F. culmorum* (7 days old) in the center of potato dextrose agar (PDA) medium. PDA dishes inoculated only with *F. culmorum* served as control. Plates were incubated for 5-7 days at 28°C. Growth radius of *F. culmorum* towards bacterial colonies was measured daily until no further growth was detected. The inhibition rate (IR) was calculated by  $\text{IR} = \text{R1-R2} / \text{R1} \times 100$ , where R1 is the colony radius of *F. culmorum* in the control plate and

R2 is the colony radius of *F. culmorum* in the presence of bacterial strains. For each bacterial isolate, five replicates were run and the whole experiment was repeated twice.

### **Antibiosis of selected bacterial strains**

The five isolates selected based on their growth inhibition percentage calculated during the dual culture assay were further studied for their *in vitro* antibiosis activity [39]. Liquid LB media (25 mL for each repetition) were inoculated with 1 mL of fresh bacterial culture (OD at 595 nm = 1) in 50 mL conical centrifuge tubes. After 48 h of incubation at 37°C under constant shaking, culture media were centrifuged at 8000 x g for 5 min to collect the supernatant then sterilized by three steps of filtration (0.45 µm once and 0.2 µm twice). PDA medium with 30 g of agar per liter was prepared then kept at 55°C in a water bath, 20 mL of each bacterial filtrate was mixed with the same volume of PDA medium then poured onto Petri plates. Three replicates for each treatment were run and for the control plates PDA medium, which were only mixed with a filtrated LB media. All plates were inoculated with mycelial plugs of *F. culmorum* and incubated for 7 days in the dark at 28°C. The growth surface was calculated using ImageJ software. The growth inhibition percentage was calculated using the formula: Inhibition percentage = Growth surface in the control plates – Growth surface in the treated medium / Mean of growth surface in the control plates x 100.

### **Inhibition of macroconidia formation**

To assess the formation of *F. culmorum* macroconidia in the presence of the five selected bacterial strains, plates of the dual confrontation assay were kept at 28°C for one month and agar blocks (4 mm in diameter) were excised from the *F. culmorum* growth surface, transferred to tubes containing 1 mL of sterilized water (two plugs per tube in three technical replicates) and vortexed for 30 s. The number of macroconidia was determined under a light microscope using KOVA Glasstic slides, as described by Semighini et al [40].

### **Effect of selected bacterial strains on *F. culmorum* macroconidia germination**

The effect of bacterial strains on the germination of *F. culmorum* macroconidia was evaluated with two methods, using the living bacteria or their intracellular metabolites.

For the experiment using living bacteria, we used the method described by Bruissson et al [41] with some modifications. Briefly, *F. culmorum* spores were obtained from a PDA culture and suspended in a PDB medium. The spore concentration was then adjusted to  $2.10^5$  spores mL<sup>-1</sup>. A 100 µL aliquot of this sporal suspension was mixed with 100 µL of fresh bacterial culture in sterilized liquid LB medium (OD at 595 nm = 1). Control samples consisted of 100 µL of spore suspension ( $2.10^5$  spores mL<sup>-1</sup>) mixed with 100 µL of sterilized liquid LB medium. Each treatment was replicated three times. The resulting 200 µL mixture (total volume) was inoculated onto PDA medium and incubated at 28°C for 5 days for visual observation of mycelial growth. To confirm macroconidia germination at a macroscopic level, the same mixture was placed in Eppendorf tubes under the same conditions. A drop of this mixture was then placed on a glass slide, and the germination examined under an optical microscope.

In the second approach, the inhibitory effect of the intracellular metabolites was assessed. Fresh bacterial cultures from LB liquid medium were centrifuged at 8000 x g for 15 min. The supernatant was removed and the pellet was retained. To obtain the intracellular fraction, the pellet containing the bacterial cells was



washed with a 1% NaCl solution to remove any remaining supernatant. It was then resuspended in 800  $\mu\text{L}$  of TEP buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA and 0.001% (w/v) phenylmethylsulfonyl fluoride), and the final optical density (OD) at 595 nm was adjusted to 1. The pellet was sonicated for one minute with 3 cycles of 10 seconds pulse on/off on ice using a Vibra Cell™ VCX 130 ultrasonic processor with an amplitude of 50%. After sonication, the samples were centrifuged for 30 min at 12,000 rpm. The supernatant was filtered twice using a 0.2  $\mu\text{m}$  filter, and the intracellular fraction was stored at 4°C for further use.

For the assay, we used the method described by Bruisson et al [41] with slight modifications: 4.95  $\mu\text{L}$  of the intracellular fraction was mixed with 1.65  $\mu\text{L}$  of *F. culmorum* macroconidia (suspended in PDB medium) at a final concentration of  $2.10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$  on KOVA Glasstic slides. The control was 4.95  $\mu\text{L}$  of TEP buffer mixed with 1.65  $\mu\text{L}$  of *F. culmorum* macroconidia (suspended in PDB medium) at a final concentration of  $2.10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$ . This assay was performed five times and repeated twice. The KOVA Glasstic slides were placed in a humid box at 28°C, and observed under an optical microscope at 6, 12, 24 and 96 hours. The analysis criteria were the percentage of germinated macroconidia (%g), germ tube length corresponding to hyphae length (Lh in  $\mu\text{m}$ ) per square (0.33 mm x 0.33 mm) in KOVA Glasstic slides measured using ImageJ, and the morphology of hyphae [41].

## **Bioassay and plant material**

The effect of isolated bacteria on durum wheat was tested interm of seedling growth in a greenhouse for 3 weeks. The variety “Karim”, one of the most widely used and productive durum wheat varieties in Tunisia, was chosen for this study. Karim seeds were provided by the National Institute of Agronomic Research of Tunisia (INRAT).

### **Seeds sterilization and inoculum preparation for the *in vivo* and *in planta* assays**

Fresh bacterial cultures were scraped off with 3 mL of sterile distilled water, placed in 10 mL of Luria Bertani (LB) broth, and shaken for 24 h. This medium was also used for the preparation of inocula suspensions to ensure the viability of bacteria after inoculation. The final concentration of the viable bacteria was adjusted to  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  just before inoculation. Wheat seeds were surface sterilized as described by Fernandez and Chen [42] with minor modifications. Seeds were washed with tap water, sterilized by immersion in 0.5% sodium hypochlorite for 5 min, and washed three times with sterile distilled water. After drying overnight on filter paper under aseptic conditions, sterilized seeds were placed in sterile dishes for further use.

### **Evaluation of plant growth variables and ecophysiology trait estimation under greenhouse conditions**

Sterilized wheat seeds were soaked in 20 mL of bacterial suspension ( $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) for 24 h with slow shaking [43], and sown in pots 6,5 cm x 6,5 cm (one seed per pot for six repetitions) filled with 1/3 sterilized sand and 2/3 soil. The pots were stored in a controlled greenhouse under the following conditions: 16/8 h light/dark photoperiod under an illumination of photosynthetic photon flux density  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a temperature of  $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , and a relative humidity of  $65 \pm 5\%$ . One week after seedling emergence, 1 mL of

inoculum ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) was applied at the base of each seedling. Seedlings inoculated with only sterile LB served as controls. All pots were placed in a greenhouse and watered on alternate days with tap water.

After 21 days under greenhouse conditions, plants were gently harvested, and roots were removed from the soil and washed with tap water. The morphological variables were recorded, including length and fresh weight of roots and shoots. Biomass was oven-dried at 60°C for 3 days, and dry weight was measured. At the same time, 0.5 g samples of root and leaf tissues were taken for the analysis of defense related genes. These samples were promptly treated with liquid nitrogen and frozen at -80°C for RNA extraction.

To quantify the content of chlorophylls (Chl) and epidermal flavonols (Flav) and their ratio, the nitrogen balance index (NBI), a non-destructive method was used, consisting of a Dualex sensor (Force-A, France) performing instantaneous quantification [44]. Measurements were made on uniform, fully developed light-exposed leaves of the same plants.

### **Total RNA isolation, cDNA synthesis and quantitative PCR of defense-related genes**

To determine the expression levels of candidate genes inherent to both plant growth and immune performance, total RNA was extracted from roots and leaves of 15 plants used in the above experimental setup, randomly distributed beforehand into three biological replicates. Organs were carefully sampled, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Samples were ground to a fine powder with three metallic balls (diameter 5mm) for 90 s in Eppendorf tubes. Total RNA was extracted from 25 mg of samples and treated with a CTAB extraction buffer (cetyltrimethylammonium bromide) as previously described in Ben Amira et al [45]. RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop™ Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop®, France). First-strand cDNA was synthesized using 2 µg of purified total RNA with Oligo-dT using the SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and stored at -20°C for further use.

Real-time quantitative PCR was carried out on an *Applied Biosystems* StepOnePlus™ Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). The amplification reactions were performed with 15 µL of final mixture consisting of 12.5 µL of Takyon™ Rox SYBR® MasteMix dTTP Blue (Eurogentec, Liege Science Park, Belgium), 1 µL of 1:30 diluted cDNA, and 100 nM primers (detailed in **S1 Table**). *qRT-PCR* reactions were set up with the following thermal cycles: pre-denaturing at 94°C for 5 min, and 40 cycles of 94°C for 10 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 10 s. PCR reactions were ended by generating a dissociation curve of 60-95°C with an increment of 0.3°C / 15 s to ensure primer dimers and nonspecific amplifications. For each primer pair, PCR conditions were determined by comparing threshold values in a dilution series of the RT product (0, x10, x20, x40, x80), followed by non-template control for each primer pair. Specific amplification of only one desired band was observed using each primer combination for RT-*qPCR* analysis, and PCR efficiency was calculated for each primer pair. The amplification of five wheat encoding-housekeeping genes (*Actin* (*ACT*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (*RPN*), RNaseL inhibitor-like (*RLI*), and 26S ribosomal RNA (*26S rRNA*)) were used as internal controls for normalizing all amplification data. These genes were chosen from a range of widely-used housekeeping genes, and specifically selected for their stable expressions during PGPR treatments. Each referrer belongs to protein families involved in different cell processes to minimize the risk of co-regulations. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

method was used to evaluate the relative expression of defense-related genes [46]. PCR reactions were performed in triplicate.

## Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software (version 4.2.1) [47], with the application of the stats packages rstatix and bestNormalize. Data normality and homogeneity of variance were examined with Levene's test and the Kolmogorov-Smirnov test, respectively, together with visual inspection of the residuals. When normality and homoscedasticity were assumed, the data underwent a standard statistical method of analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD post-hoc test ( $p \leq 0.05$ ). When normality and homoscedasticity did not hold, the Kruskal-Wallis test based on ranks of the data was used. Epsilon squared was used as the measure of the Kruskal-Wallis test effect size [48]. It ranged between 0 and 1 and indicated the ratio of variance in the response variable explained by the explanatory variable, the Strain factor. Kruskal-Wallis test was followed by Dunn's post-hoc test. In *q*PCR analyses,  $\text{Log}_2\Delta\Delta\text{Ct}$  values were calculated for each sample. Relevant data transformations were performed, and homogeneity of variances was verified on transferred data. For leaves and roots, a multiple *t*-test was applied to determine significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between untreated and PGPR-inoculated organs, and *p*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg (BH) procedure.

## Results and Discussion

### Diversity of the isolated bacterial endophytes

The plant growth-promoting potential of rhizobacteria isolated from wheat roots grown in an organic farming system in Tunisia and their *in vitro* biological control capacity against *F. culmorum* (the causal agent of fusarium seedling and head blight diseases, FSB and FHB, resp.) was examined and characterized in a multidisciplinary approach.

Fourteen endophytic bacterial strains of healthy wheat root were isolated using the enrichment culture technique, one of the conventional approaches using Tryptic soy agar medium, and then underwent molecular, physiological and biochemical characterizations. The culture-dependent method recovered representative genera that after subsequent testing of their functional abilities both *in vitro* and *in planta* could offer a promising strategy for the development of new beneficial inoculants. The macroscopic appearance of the isolates is shown in **S1 Figure**.

The molecular characterization of each bacterial strain was based on the sequencing of the *16S rRNA* gene. The subsequent Blast analysis from the NCBI gene databank (**Fig 1a**) combined with a global phylogenetic distribution using the maximum likelihood analysis implemented in the PhyML program (**Fig 1b**), showed that strains fell into two phylum-divisions: *Pseudomonadota* and *Bacillota*. *Bacillota* was found to be the predominant endophytic bacterial phyla in our study. In these two phyla, eight genera were identifiable; namely *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Variovorax* and *Bacillus*. The last genus is the most abundantly represented with five different species. Species of the genus *Paenibacillus* were originally considered to belong to the genus *Bacillus*, based on morphological characteristics, but were later reclassified as a separate genus in 1993 [49,50]. The predominance observed here echoes the finding that bacilli from *Bacillota* form the dominant bacterial class with Gammaproteobacteria of the *Pseudomonadota* in the endophyte community in aerial and underground parts of wheat [51].

In detail and at species grade level, NCBI best hits showed that the percentage identity of 11 strains out of 14 exceeded 99%, but was less than 95% for the rest of the strains. The phylogenetic analysis with phylum-closed sequences retrieved from NCBI shown that our isolated strains were probably *Achromobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus halotolerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter hormaechei*, *Paenibacillus peoriae*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Rhizobium* sp., and *Variovorax paradoxus*.

The *16S rRNA* gene sequence is the most common housekeeping genetic marker and has been used to study bacterial phylogeny and taxonomy for several reasons. Firstly, this gene is present in nearly all bacteria, often occurring as a multigene family or operons. Also, the functional role of the *16S rRNA* gene has remained consistent over time, indicating that random sequence variations serve as a more accurate measure of evolutionary time. Lastly, the *16S rRNA* gene, spanning approximately 1,500 base pairs, offers a large enough dataset for computational analysis [52]. The usefulness of *16S rRNA* gene sequencing as a tool in microbial identification is well-established, although it may have limited phylogenetic power at the species level and poor discriminatory power for some genera, especially for strains that belong to common

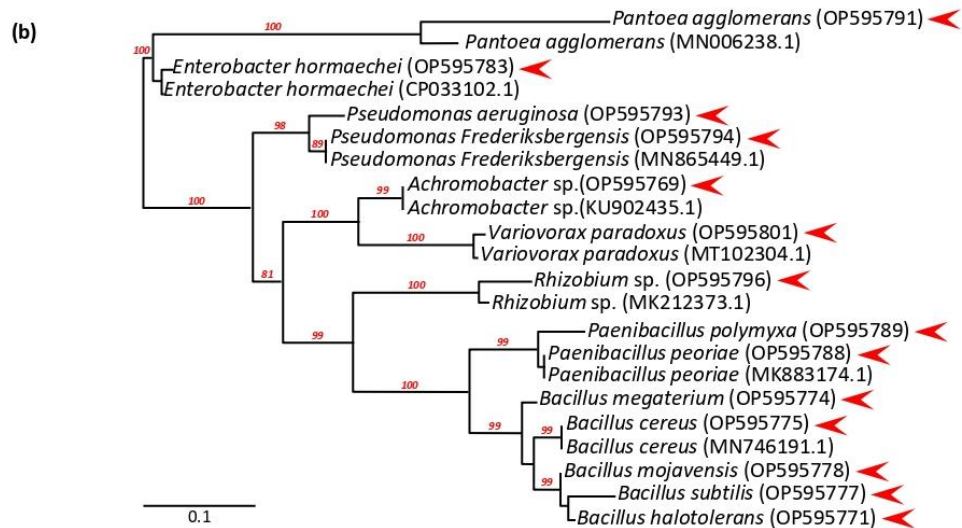
sub-species clades [53]. In addition, it is dependent on the deposition of complete unambiguous nucleotide sequences into databases and applying the correct "label" to each sequence [54]. Interestingly, some bacterial strains had a homology less than 97%, implying that they may be new species [55].

The "core microbiome" is a term now widely used to refer to members that are consistent features of a dataset hypothesized to reflect underlying functional relationships of a specific bacterial population with the host [56]. Determining this core is challenging for lack of an appropriate method. Furthermore, we emphasize that the 14 species in our study are not exhaustive and the absence of some bacterial taxa does not mean that they are not present in our samples. However, the diversity and dominance of certain taxa (known as major taxa) observed in previous studies were also observed in our study. *Pseudomonas* was among dominant endophytic genera in *T. aestivum* in roots, leaves, and coleoptiles, while *Paenibacillus*, which is a core genus specific to *T. aestivum*, and *Variovorax* were subdominant bacterial genera hosted by these tissues [57]. In our study, bacilli showed the greatest diversity of species. This predominance may be due to the ability of *Bacillus* species to form endospores that survive under harsh conditions and to produce bactericidal substances that inhibit competitors in the rhizosphere [58].

The microorganisms that interact with plants are mainly common species and in some cases niche-specific. Some species that belong to the *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, and *Variovorax* genera are among the most typical wheat endophytes [59]. Species such as *B. subtilis*, *P. polymyxa* and *P. aeruginosa* have been reported in different parts of the plant including internal tissues [60,61]. Comby et al [51] observed that *B. megaterium* with *Microdochium bolleyi* and *Gaeumannomyces graminis* were indicator species characteristic of wheat roots, while *B. mojavensis* was a specific species of the rhizosphere colonizing rhizoplane and spaces between cortical cells [62,63]. Other genera such as *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, and *Pseudomonas* are also related to the wheat rhizospheric microbiome [61,64].

(a)

Phylum	Isolated Species	Accession number (NCBI)	Best hit - Related strain	% identity	CDS length
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Achromobacter</i> sp.	OP595769	<i>Achromobacter</i> sp. MYb9 (KU902435.1)	99.64%	1425
	<i>Bacillus cereus</i>	OP595775	<i>Bacillus cereus</i> strain LXJ76 (MN746191.1)	99.65%	1460
	<i>Bacillus halotolerans</i>	OP595771	<i>Bacillus halotolerans</i> strain ROA207 (MZ317478.1)	99.57%	1467
<i>Bacillota</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	OP595774	<i>Bacillus megaterium</i> strain SCSIO_43708 (MH283792.1)	99.59%	1466
	<i>Bacillus mojavensis</i>	OP595778	<i>Bacillus mojavensis</i> strain A21 (EU366229.1)	99.79%	1467
	<i>Bacillus subtilis</i>	OP595777	<i>Bacillus subtilis</i> strain T85 1 (MT197332.1)	94.51%	1425
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	OP595783	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain L51 (CP033102.1)	99.49%	1392
	<i>Paenibacillus peoriae</i>	OP595788	<i>Paenibacillus peoriae</i> strain D71_S03R (MK883174.1)	99.78%	1389
<i>Bacillota</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	OP595789	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain R191 (MK100924.1)	99.01%	1441
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	OP595791	<i>P. agglomerans</i> strain LA131 (MN006238.1)	85.35%	1194
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OP595793	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain HL2 (KF413420.1)	100.00%	1350
	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	OP595794	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (MN865449.1)	99.65%	1450
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	OP595796	<i>Rhizobium</i> sp. Strain IAUk3223 (MK212373.1)	92.30%	1295
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Variovorax paradoxus</i>	OP595801	<i>Variovorax paradoxus</i> strain JZY4-58 165 (MT102304.1)	99.07%	1399



**Fig 1. Molecular characterization of the isolated root endophytic bacterial strains selected for this work. (a)** Detailed molecular characteristics of the isolated root endophytic bacterial strains. **(b)** 16S-RNA based molecular phylogenetic distribution of the bacterial isolates (red triangle) with Phylum-closed sequences retrieved from NCBI was generated using the maximum likelihood analysis implemented in the PhyML program. Values of the bootstrap analysis (1000 repetitions) are given at the nodes. Bar 0.1 corresponds to the nucleotide substitution per sequence position. Morphological appearance of the new strains is shown in S1 Figure.

## Plant growth promoting abilities of the isolated root endophytes

We examined the plant growth-promoting abilities of the 14 isolated endophytic bacteria for their potential as bio-inoculants to wheat plants. To this end, bacterial strains were individually inoculated to wheat seeds before sowing under controlled conditions. After 21 days of growth in pots, results showed that all root-associated bacterial strains exerted significant positive effects on the growth and several ecophysiological variables. Compared with control plants treated with sterile LB, each strain showed at least one significant stimulatory effect out of the eight measured growth variables. Interestingly, all these species have been reported as plant growth-promoting agents for wheat and/or other plant species, such as fenugreek (*Achromobacter sp.*), lily (*B. halotolerans*), chickpea (*B. subtilis*), bean (*Enterobacter hormaechei*), grapevine (*Paenibacillus peoriae*), tomato (*Paenibacillus polymyxa*), pepper (*Pseudomonas Frederiksbergensis*), and alfalfa (*Variovorax paradoxus*) [65-72].

The most positively affected variables were shoot fresh weight, and root fresh and dry weight. Eleven strains out of the 14 strains tested significantly increased shoot and root biomass compared with the controls. The least affected variable was leaf epidermal flavonol content, in which no significant effects were observed for any of the inoculated plants (Figs 2b, 2c and 2d). Flavonoids and related phenolic compounds are secondary metabolites produced by plants in response to various stresses and play a major role in improving plant-microbe interactions [73,74]. Flavonoids are thought to regulate the endophytic microbial community in roots. A flavonoid accumulation might increase the environmental pressure on endophytes, thus affecting the endophytic community [75] because some flavonoids, known to be antibacterial agents, can inhibit the growth of many microorganisms [76]. Here we detected no significant increase or decrease in leaf epidermal flavonol content of any of the inoculated wheat seedlings compared with the controls, although some trends were apparent with *B. megaterium*, *P. peoriae*, *P. agglomerans*, and *Rhizobium sp* (Fig 2c). Given that flavonols, which are primary flavonoids in nature, play a key role in plant-endophytes interactions, we can assume that the symbiosis of these endophytic bacteria and wheat seedlings was not profoundly affected.

The increased root biomass could be related to the bacterial production of indole-related compounds (IRCs). All strains tested positive for the IRCs, with ranging production levels. The highest amount was recorded for *P. agglomerans* (37.40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); this species was reported as a *T. aestivum* root-growth promoting agent [77]. Several factors could explain these variations of IRC production between strains, including the differential modulation of the biosynthetic pathways between strains and/or the thermodynamic features of enzymes that convert primary heterocyclic aromatic organic compounds (*L*-tryptophan) into related indole conjugate forms [78]. Every root-associated endophytic bacterium is able to produce IRCs, which potentially could include indole-3-acetic acid (IAA). IAA helps potentiate plant nutrition by absorbing nutrients from the soil through enhancing root development [79]. Consequently, this phytohormone is considered as the main effector substance in plant-bacteria interaction, phytostimulation, and plant immunity [80]. Furthermore, the *in vitro* production of IRCs in the presence of *L*-tryptophan, which is generally considered an IAA precursor [81], might not reflect the *in situ* processes, as plants and root endophytes interact as a holobiome, and/or other organisms from the endophytic community might

participate. Additional analysis such as high-pressure liquid chromatography (HPLC) is needed to validate the hormonal factor influencing wheat root growth [82].

Inoculation with 11 strains out of the 14 tested isolates gave significantly higher values of shoot fresh weight than non-inoculated plants, and to in a lesser extent of shoot dry weight and length. These data highlight the potential of these bacterial strains to enhance shoot development and biomass accumulation (Figs 2a and 2b). Interestingly, this physiological effect can be correlated with the leaf chlorophyll contents, one of the key regulators of efficient photosynthesis [83]. Wheat seedlings had significantly higher values than the controls when inoculated with *Achromobacter sp.*, *B. cereus*, *B. halotolerans*, *B. mojavensis*, *P. frederiksbergensis*, and the strains *V. paradoxus* and *P. peoriae* caused the highest increase in chlorophyll content of over 127% for each strain. Chlorophylls are the principal photosynthetic pigment harvesting and converting light energy, and its enhanced synthesis improves photosynthetic rate and PSII efficiency [84]. Enhancement of photosynthesis in plants by PGPR was reported by Sati et al [85].

A significant reduction in leaf chlorophyll content of more than 50% was observed in plants inoculated with *P. aeruginosa*, which also induced a significant increase in other growth-related variables (shoot and root biomass). This effect can be attributed to a complex interaction of several factors, or trade-offs, in this case between the physiological processes of defense and growth. Activation of defense genes can lead to the production of secondary metabolites, including phytoalexins and pathogenesis-related proteins, which may divert resources away from chlorophyll synthesis, so leading to reduced chlorophyll content [86]. Hormonal crosstalk, including jasmonic acid- and salicylic acid-dependent pathways, appears to play a major role in regulating these tradeoffs, and is modulated by bacterial endophytes. If a bacterial strain primarily activates jasmonic acid-mediated defense responses, this can lead to suppressed growth and chlorophyll synthesis [87]. Another factor could explain this effect, namely the differential responses of the host toward the bacterial endophyte. Each plant-bacteria interaction is unique, and the response of one particular plant to a specific bacterial strain may differ from another's. The expression of defense- and growth-related genes can vary according to the plant's genetic makeup, its developmental stage, and environmental conditions [88]. To gain deeper insights into these mechanisms, in-depth molecular studies may be necessary to analyze the signaling pathways involved in the plant's defense response and the specific interactions between endophytes and the plant. This approach would help provide a better understanding of the effects of bacterial endophytes on defense responses and plant growth and identify the underlying mechanisms responsible for the reduction in chlorophyll content.

The nitrogen balance index NBI is the ratio of chlorophylls to epidermal flavonols (Chl/Flav) [89], an informative indicator for crop growth. Measuring NBI allows rapid monitoring of both high and low nitrogen status, providing farmers with accurate information to make timely N management decisions. In our study, the NBI values correlated with the growth stimulatory effect of the tested bacterial strains. A significant increase in NBI was noted for plants inoculated with *P. peoriae*, *P. frederiksbergensis* and *V. paradoxus* (Fig 2c) indicating a high nitrogen content and a high nitrogen use efficiency [90].

Another strategy used by the endophytic bacteria to stimulate plant growth is ammonia production. This beneficial metabolite can help meet the plant's need for nitrogen [94,92]. Interestingly, our results showed



that all the 14 bacterial endophytes were able to produce ammonia. This production ranged from low production at about  $0.86 \mu\text{M mL}^{-1}$  for *P. polymyxa* to high production at about  $12.87 \mu\text{M mL}^{-1}$  for *V. paradoxus* (**Fig 3a**). This finding is in line with Alkahtani et al [93], who reported the ability of endophytic bacteria to produce ammonia using the Nessler's reagent method.

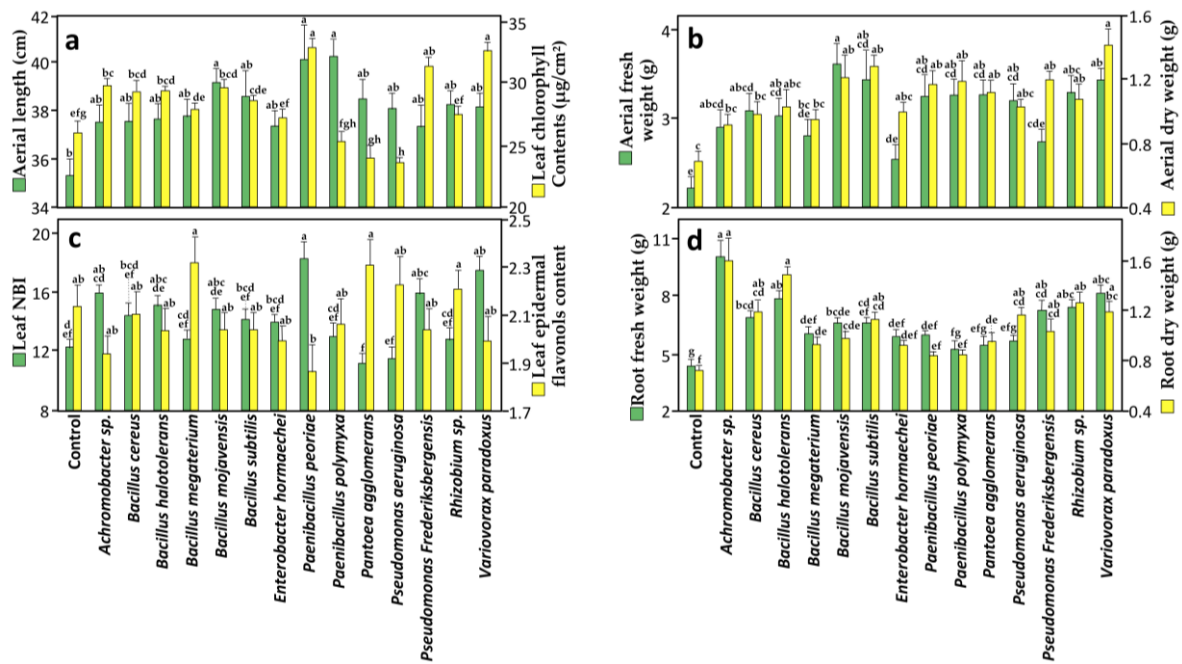
The beneficial effects observed in our study align with other direct mechanisms such as phosphate solubilization. Phosphorus is an essential nutrient for plant growth. This macronutrient is present in soil as phosphate, usually as complexes with calcium, iron and aluminum, making it relatively unavailable to plants [94]. Endophytic bacteria have the ability to solubilize inorganic phosphate, making it available for plant uses through the production of organic acid anions [95,96]. Our analysis showed that eight bacterial strains out of the 14 isolates could solubilize tri-calcium phosphate forming clear zones on Pikoviskaya agar media (Fig 3a and S2 Figure). Similar studies have reported that the same bacterial species as found positive for phosphate solubilization in our study are able to release accessible forms of phosphate [97-102].

In the same context of enhancing plant nutrient uptake, *in vitro* screening on minimal media containing an insoluble form of Zn, namely its oxide (ZnO), was conducted to test the presence of zinc-solubilizing bacteria (ZSB) among the 14 bacterial endophytes. Zn is a vital micronutrient for cell life. About 10% of enzymes require zinc as a cofactor and its deficiency leads to many metabolic disorders [103, 104]. Several approaches are used in agronomical practices to improve uptake of Zn. ZSB have been selected as natural biofortification agents to amplify Zn concentration, offering a new dimension in crop improvement program to mitigate Zn deficiencies [105,106]. Zinc solubilization potential of the bacterial isolates was assessed by determining the solubilizing efficiency (SE) in plate assays. Among the 14 isolates, six strains were able to solubilize ZnO. The efficiency of these bacterial strains was checked based on colony and halozone surface. Among them, *P. frederiksbergensis* showed the highest SE of about 368%. This was significantly different from *B. megaterium*, *P. aeruginosa* and *P. agglomerans*, which showed lower SE value of 254%, 175%, and 173% respectively (**Fig 3a**). Our results are consistent with those of many studies showing the role of these endophytic bacterial species in zinc solubilization [107-110].

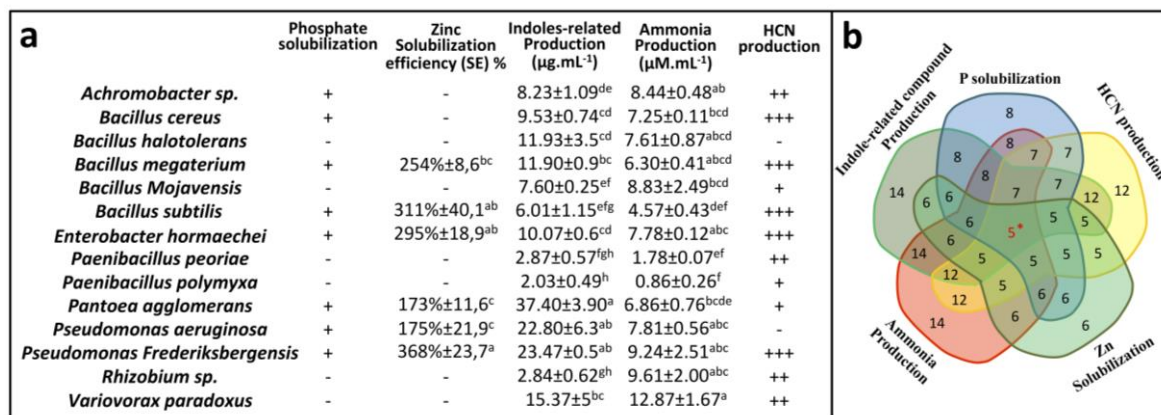
One last trait assessed in the present study that could be indirectly related to the observed plant growth-promoting effect, is the production of volatile toxic hydrogen cyanide (HCN). Almost all the isolates (12 isolates out of 14) were positive for HCN production *in vitro*. *B. megaterium*, *E. hormaechei*, *B. subtilis*, *B. cereus* and *P. frederiksbergensis* exhibited the highest HCN production as indicated by a very deep red color on the filter paper (**Fig 3a and S2 Figure**). HCN is one of a number of chemical substances released by bacteria that can combat plant diseases. Its toxicity is thought to be linked to its reactivity in the electron transport chain, leading to cell death [111]. In addition, HCN secretions seem correlated with the priming of the root length and root hair germination, interacting with the phytohormonal network of organogenesis and plant growth [112]. The result obtained, consistent with other findings [113], suggests the possible use of our HCN-producing endophytes as biofertilizers and biocontrol agents in plant disease suppressiveness [112,114].

To select the best isolates among the endophytic strains evaluated with high plant growth-promoting potential, a scale was generated and used to assess the PGPR traits. In this scale, the maximum score was

13, considering 1 point for each positive result among the five *in vitro* tests and 1 point for each significant increase among the eight growth variables measured *in planta*. *In vitro*, the following five strains showed high scores for all the PGP traits (**Fig 3b**): *P. frederiksbergensis*, *P. agglomerans*, *E. hormaechei*, *B. subtilis*, and *B. megaterium*. *In planta*, three different strains (*B. mojavensis*, *P. peoriae* and *V. paradoxus*) obtained six points out of 8, confirming that outcomes depend on several factors, such as the environment, and vary among bacterial isolates. Endophytic impacts on plant performance cannot therefore be easily inferred from simplified *in vitro* assays, although they do offer relevant leads -and very valuable mechanistic knowledge- which will need to be validated by field trials. All in all, *P. frederiksbergensis* was the most effective strain showing the highest value of 10 points. This species has been reported to enhance wheat seed germination and to induce different degrees of wheat seedling growth including shoot and root weight and height, confirming its potential as a biofertilizer for wheat crops [115].



**Fig 2. Effect of root endophytic bacterial strains on wheat physio-morphological parameters. (a)** aerial length and leaf chlorophyll contents, **(b)** aerial fresh and dry weight, **(c)** leaf NBI and epidermal flavonol content, and **(d)** root fresh and dry weight of wheat plants (Karim variety) after 21 days of cultivation under greenhouse conditions. Data correspond to the mean of a minimum of ten repetitions  $\pm$  SE. Different letters above data show the significant differences within rows ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig 3. Plant growth-promoting (PGP) traits of the root endophytic bacterial strains. (a)** The symbols “+” and “-” correspond to a semi-quantitative assessment of the recorded activities (“+”, positive; “-” negative activity). Data correspond to the mean of a minimum of three biological replicates  $\pm$  SE. Different letters above data show the significant differences within rows ( $p \leq 0.05$ ). HCN, hydrogen cyanide. **(b)** Venn diagram representing the number of species showing positive results for different PGP traits (5\*, number of species showed positive results for all the PGP traits). The variables for quantifying the measured biochemical activities are detailed in **Fig S2**.

## **Biological control activity of the bacterial endophytes against *Fusarium culmorum***

### **Direct Antagonism**

Recent research on endophytes has demonstrated their ability to strengthen the host's defense against diseases and mitigate damage caused by pathogenic microorganisms [116,117]. The ability of endophytes to colonize the internal tissues of plants would be a significant advantage over other biocontrol agents in providing protection for plants against many pathogens. Endophytes are accordingly the subject of ongoing studies [118]. To assess this antagonistic activity, the most commonly used strategies are *in vitro* direct plate antagonistic reaction against pathogens or comparing the survival rate of inoculated plants with controls. However, knowledge of endophytes in general, their interactions with plant pathogens, and endophyte-induced plant regulation, is far from complete. In this study, we investigated the antagonistic activity of the 14 root endophytic bacterial isolates against *F. culmorum*, the causal agent of fusarium foot and root rot (FFRR), and seedling and head blight diseases (FSB and FHB). The evaluation included direct confrontation tests on PDA medium to assess the inhibition of *F. culmorum* growth by the bacterial isolates.

In dual assays allowing exchange of both volatile and diffusible metabolites, out of the 14 root-associated bacterial isolates tested, nine strains demonstrated antagonistic activity against *F. culmorum*. The inhibition rates ranged from 4% to 66%, indicating significant variations in the effectiveness of the isolates in suppressing *F. culmorum* growth. Among these strains, *P. peoriae*, *P. polymyxa*, *P. agglomerans*, *P. aeruginosa*, and *B. cereus* had effective antagonistic activity of over 40%, stable over time (**Fig 4a** and **S3 Figure**). They were selected for the other *in vitro* assays. The dual assay was repeated for these five strains and gave the same results (data not shown). The antagonistic activity displayed by the selected bacterial endophytes against *F. culmorum* highlights their potential as biocontrol agents. This behavior suggests an antibiosis mechanism, implying the production of active fungicidal compounds, which may be volatile and/or diffusible in the environment. Interestingly, endophytic bacteria have been reported to produce various volatile organic compounds (VOCs) that have a significant role in the control of a broad range of phytopathogens and may be involved in the observed antagonistic effect observed by us [119-121].

The ability of endophytic microbes to produce hydrolytic enzymes is commonly associated with their plant growth-promoting activity and antagonistic potential against phytopathogens [122]. In our study, all the 14 root-associated bacterial isolates tested positive for extracellular enzyme production, revealed by visible bubbling and degradation zones surrounding bacterial colonies, demonstrating the presence of at least two out of the five evaluated enzymes (Fig 4b and S3 Figure). These enzymes could be attributed to the successful symbiotic relationship between endophytes and their host plant being used to penetrate plant tissues, improve induced systematic resistance, and degrade pathogen cell walls [123]. All the strains were catalase-positive. This enzyme is the first defense line used by microbes to scavenge toxic free radicals generated from biotic and abiotic stress, so indirectly promoting plant growth [124]. The lytic enzymes tested here, such as protease, cellulase, and amylase, may be involved in the degradation of the fungal cell wall and the lysis of the fungal mycelia, while pectinase has been reported to reduce pathogenesis in plants [125].

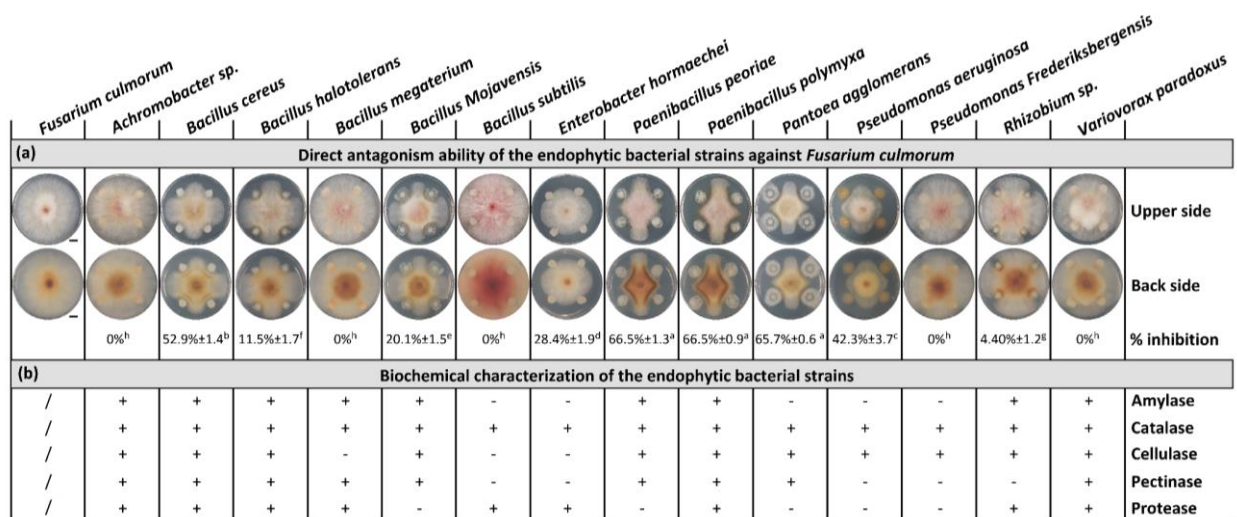
The production of extracellular enzymes is a process shared between antagonistic and non-antagonistic strains. This suggests that enzymatic activity may not be the sole determinant of antagonistic potential against *F. culmorum*, and that it requires a combination of other mechanisms (e.g., antibiosis and competition for nutrients or space) [126,127]. In contrast, the simultaneous presence of enzymatic activity and antagonistic potential in certain bacterial strains suggests a multifaceted approach to biocontrol. These strains may use a combination of enzymatic degradation and the production of antifungal compounds to inhibit the growth and development of *F. culmorum*. The synergistic effects of enzyme activity, antifungal metabolites, and volatile organic compounds may enhance their biocontrol efficacy. Further work is needed to elucidate the specific mechanisms by which enzymatic activity contributes to antagonistic potential. This could involve exploring the correlation between enzyme activity levels and the inhibition of *F. culmorum* growth, and identifying the specific enzymes and metabolites responsible for the observed effects.

The selection of *P. polymyxa*, *P. peoriae*, *P. aeruginosa*, *P. agglomerans*, and *B. cereus* as the most effective isolates provides promising candidates for further investigation. These isolates demonstrated inhibition rates exceeding 50%, indicating their strong antagonistic potential against *F. culmorum*. Several studies have provided insights into the antagonistic activity of our selected bacterial strain against *F. culmorum*: *P. polymyxa* [128], *P. aeruginosa* [129], *P. agglomerans* [130], *B. cereus* [131], but to the best of our knowledge, ours is the first thorough evaluation of the antagonistic potential of *P. peoriae* against *F. culmorum*.

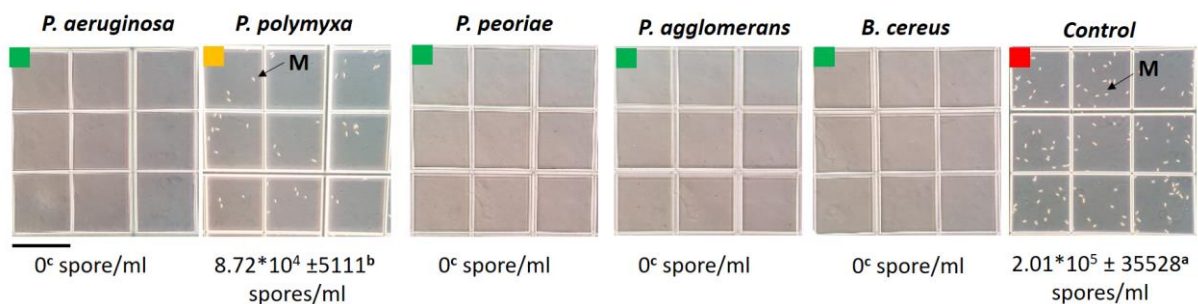
### **Inhibition of *Fusarium culmorum* sporulation**

Sporulation plays a crucial role in the life cycle of *F. culmorum*, and the highly effective spore dispersal ability of this fungus accounts for its extensive dissemination [132,133]. *F. culmorum* produces asexual spores such as macroconidia and chlamydoconidia that form the most efficient means of reproduction and the main source of plant contamination [134]. Investigating the impact of the selected bacterial strains on *F. culmorum* sporulation can therefore provide valuable insights into their potential as biocontrol agents for controlling spore propagation and infection. Our study of the inhibition of *F. culmorum* macroconidia formation assay showed that all strains had an effect on the formation of macroconidia. In the presence of *B. cereus*, *P. agglomerans*, *P. peoriae*, and *P. aeruginosa*, *F. culmorum* macroconidia were completely absent, indicating total inhibition of *F. culmorum* sporulation. To a lesser degree, *P. polymyxa* caused partial inhibition, significantly reducing by 56.62% the number of the macroconidia formed (Fig 5).

The absence of macroconidia in the presence of *B. cereus*, *P. agglomerans*, *P. peoriae*, and *P. aeruginosa* and the reduction in sporulation induced by *P. polymyxa* suggest that these bacterial strains exert strong inhibitory effects on the spore formation of *F. culmorum*. This inhibition could be due to the modification of the environmental conditions that trigger sporulation, including pH, nutrient depletion, oxidative stress, and toxic secondary metabolites (here with antigerminative activities) produced by the competing endophytes [134]. Interestingly, the partial inhibition of *Paenibacillus polymyxa* could be due to differences in intensity of the antagonistic interaction between *P. polymyxa* and *F. culmorum*, underlining the plurality of the interactions between rhizobacteria and plants.



**Fig 4. Effect of root endophytic bacterial strains on *Fusarium culmorum* mycelial growth in dual confrontation assay (a), and qualitative assay of extracellular enzyme production (b).** Dual confrontations and biochemical analyses were recorded 5 days of incubation at 28°C. Data correspond to the mean of a minimum of four repetitions ± SE. Different letters above data show significant differences within rows ( $p \leq 0.05$ ). The symbols “+” and “-” correspond to a qualitative assessment of the recorded activities (“+”, positive; “-” negative activity). Scale bars represent 1 cm. An enlarged version of the photographic images is available in S3 Figure.



**Fig 5. Optical microscopic observation of *Fusarium culmorum* macroconidia formation after 30 days (from dual culture assay of the five selected bacterial strains).** Green square indicates total inhibition of *F. culmorum* macroconidia production, yellow square indicates partial inhibition and red square indicates macroconidia formation in the control; scale bar = 0.33 mm; M: *F. culmorum* macroconidia. Data correspond to the mean of a minimum of three biological replicates ± SD. Different letters above data show significant differences within rows ( $p \leq 0.05$ ).

## **Bacterial culture filtrates inhibited *F. culmorum* mycelial development**

The antifungal activity of the culture filtrates of the five selected bacterial strains was further evaluated. The results showed that all bacterial culture filtrates differentially inhibited *F. culmorum* mycelial growth. The rate of inhibition ranged from 10.38% for *P. aeruginosa* to 47.04% for *P. polymyxa*, which exhibited the highest inhibition rate in the dual culture assay. *F. culmorum* generally exhibits a moderate growth rate and produces a dense cottony mycelium that covers the surface of the agar medium with a smooth outer surface. In the presence of the bacterial culture filtrates, *F. culmorum* showed distinct changes in growth characteristics compared to controls. The colonies appeared thinner, with clear irregular edges, indicative of compromised mycelial density; the aerial mycelium was sparsely distributed, and the overall growth rate was notably reduced (**Fig 6**).

The observed inhibition of *F. culmorum* mycelial growth by bacterial culture filtrates suggests the presence of active substances with antifungal properties. The differential rates of inhibition indicate variations in the composition and/or concentration of these active substances among the bacterial strains. These data are in line with some reports indicating that the capacity to produce and secrete bioactive metabolites may differ even between bacterial strains belonging to the same species [135].

The secretion of hydrolytic enzymes and antimicrobial metabolites are among important traits associated with most endophytic microorganisms essential to the control of phytopathogens. These enzymes are very diverse, and some families, such as cellulases, proteases, or pectinases, have extracellular members reported to be correlated with the antifungal activity of *Bacillus simplex* and *B. subtilis* against some *Fusarium* species, resulting in fungal hyphal thinning [136,137].

Our results revealed similar activities with the five selected species that showed *F. culmorum* mycelial inhibition producing at least one of the above enzymes (**Fig 4b**). The changes in *F. culmorum* growth characteristics further emphasize the impact of bacterial culture filtrates on fungal development. These marked adverse physiological effects indicate disruptions in mycelial growth, cellular integrity, and overall fungal fitness in the presence of the active substances present in the bacterial culture filtrates. *Bacillus* strains are known to produce a broad spectrum of antimicrobial compounds. Lipopeptide biosurfactants (including surfactins, iturins, and fengycins) are the main class of antibiotics, playing essential roles in inhibiting plant pathogens growth [138]. Wang et al [139] found fengycins in particular to show significant antifungal activities against *Fusarium graminearum*, causing morphological changes in fungal cell walls and membranes [140, 141]. The effectiveness of *P. aeruginosa* relies on the production of diverse antifungal compounds such as chitinases, glucanases, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), pyoluteorin, phenazines, siderophores, and surfactants [142-144]. Similarly, *Paenibacillus* species have drawn much attention by its capacity to synthesize biological control substances including lipopeptide antibiotics, bacteriocins, and antibacterial proteins [145]. Previous research also found that *P. agglomerans* exhibited biocontrol potency, being able to produce bioactive lipopeptides inhibiting fungal growth [146]. These substances will occur in the cell-free filtrates, suggesting the sensitivity of *F. culmorum* to the diffusible metabolites produced by the bacterial endophytes during dual culture assay. The identification of these substances in future studies will be of great interest.

## **Inhibition of *F. culmorum* macroconidia germination by bacterial cells and intracellular metabolites**

To characterize the antifungal potential of these strains besides mycelial growth and sporulation, their potential to interfere with macroconidia germination was assessed by co-inoculating *F. culmorum* macroconidia with bacterial cells allowing direct interaction and physical contact.

Spores are essential in the *Fusarium* infection process and disease spread. Spore germination is known to be the first step in fungal mycelium development. Understanding the inhibitory activity of the selected bacterial endophytes on spore germination is therefore pertinent.

Visually, all bacterial strains, except for *B. cereus*, inhibited the germination of *F. culmorum* macroconidia on PDA medium, as evidenced by the absence of any visible fungal colonies (**Fig 7a**). However, microscopic examination revealed that three of these visually inhibitory strains completely suppressed germination, as indicated by the absence of any macroconidia germination. The strain *P. agglomerans*, despite visual inhibition, allowed germination at the microscopic level, but it was limited, with sparsely distributed hyphae showing abnormal characteristics, including hyphae swelling and chlamydospore formation (**Fig 7b**).

The complete inhibitory effect observed for *P. peoriae*, *P. polymyxa*, and *P. aeruginosa* is indicative of their potent antifungal activity against *F. culmorum*. These strains effectively prevented the germination of macroconidia and the emergence of germination tubes. This total inhibition suggests that these bacterial strains possess powerful mechanisms that suppress key steps in the germination process of *F. culmorum*. The prevention of macroconidial germination indicates that they interfere with the activation of metabolic processes or signaling pathways necessary for germination initiation. This inhibition of germination may be mediated by the production of substances that disrupt cell division or affect the integrity and elongation of the emerging hyphae.

*Pantoea agglomerans* exhibits a unique mode of inhibition. Although this strain visually inhibited germination, the presence of sparsely distributed hyphae at the microscopic level indicated partial germination. However, the abnormal characteristics displayed by these hyphae, such as swelling and chlamydospore formation, suggest that *P. agglomerans* exerts inhibitory effects on *F. culmorum* through inducing aberrant fungal growth. The specific mechanisms underlying this inhibition remain unclear and warrant further molecular investigation. The presence of hyphal swelling and the formation of chlamydospores -considered as survival structures- suggests that *P. agglomerans* may trigger a stress response in *F. culmorum*, probably due to specific secondary metabolites or signaling substances that interfere with fungal development. Alternatively, *P. agglomerans* might modulate the expression of fungal genes involved in cell wall biosynthesis or morphogenesis, leading to the observed morphological abnormalities.

Understanding the effects of bacterial intracellular fractions on *F. culmorum* spore germination and hyphal development is crucial for elucidating the mechanisms underlying their antagonistic activity.



Spore germination rates varied according to the bacterial strains and time intervals. At 6 hours, the control exhibited a germination rate of 82.7%, whereas this rate was significantly reduced in samples exposed to intracellular fractions of *P. agglomerans*, *P. aeruginosa*, and *B. cereus*, with 64%, 63% and 66.4% respectively. *P. peoriae* and *P. polymyxa* intracellular fractions caused a complete absence of spore germination (**Fig 8**).

At 12 h, similar trends were observed. The controls consistently showed the highest germination rates, and intracellular fractions of *P. agglomerans* exhibited a significant inhibitory effect illustrated by a delayed germination, while *P. peoriae* and *P. polymyxa* intracellular fractions continued to show no germination and no germ tube emergence was detected.

After 24 h and 96 h, no significant inhibition was noted, indicating that the inhibitory effect of the bacterial endophytes was only marked in the first 6 h of germination, except for *P. peoriae* and *P. polymyxa*, which showed complete inhibition and a strong inhibitory effect on germination even 4 days later.

Hyphal development was also influenced by bacterial intracellular fractions when germination occurred. At 6 h, the intracellular fractions of *P. agglomerans*, *P. aeruginosa*, and *B. cereus* showed no activity on mycelial growth. However, at 12 h and 24 h, the control consistently displayed the longest average hyphal lengths, while the intracellular fractions of *P. agglomerans* and *B. cereus* exhibited significant shorter lengths. After 96 h, the *P. agglomerans* intracellular fraction showed the highest inhibitory effect on mycelial growth, with less than 2 mm of mean hyphal length (per square), and significant reductions were obtained with *B. cereus* and *P. aeruginosa* (**Fig 8**).

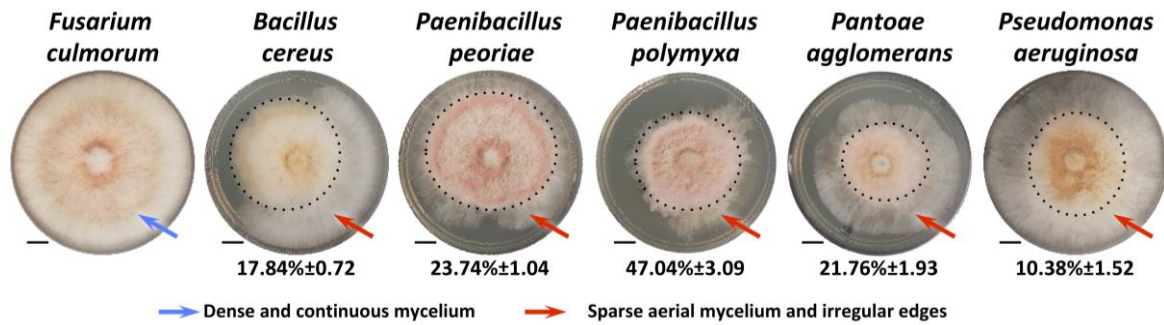
Microscopic observations revealed distinct effects of the bacterial intracellular fractions on *F. culmorum* macroconidia and hyphal morphology. The intracellular fractions of *P. polymyxa* and *P. peoriae* resulted in non-germinated macroconidia, showing their strong inhibitory effect on germination (**Figs 9a and 9b**).

Members of the *Paenibacillus* genus are able to produce antimicrobial lipopeptides. This family of secondary metabolites with broad-spectrum antimicrobial activity includes polypeptins, iturins, polymyxins, surfactins, and fusaricidins [147-150]. Fusaricidin produced by *P. polymyxa* has been reported to inhibit spore germination and disrupt hyphal membranes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* [151].

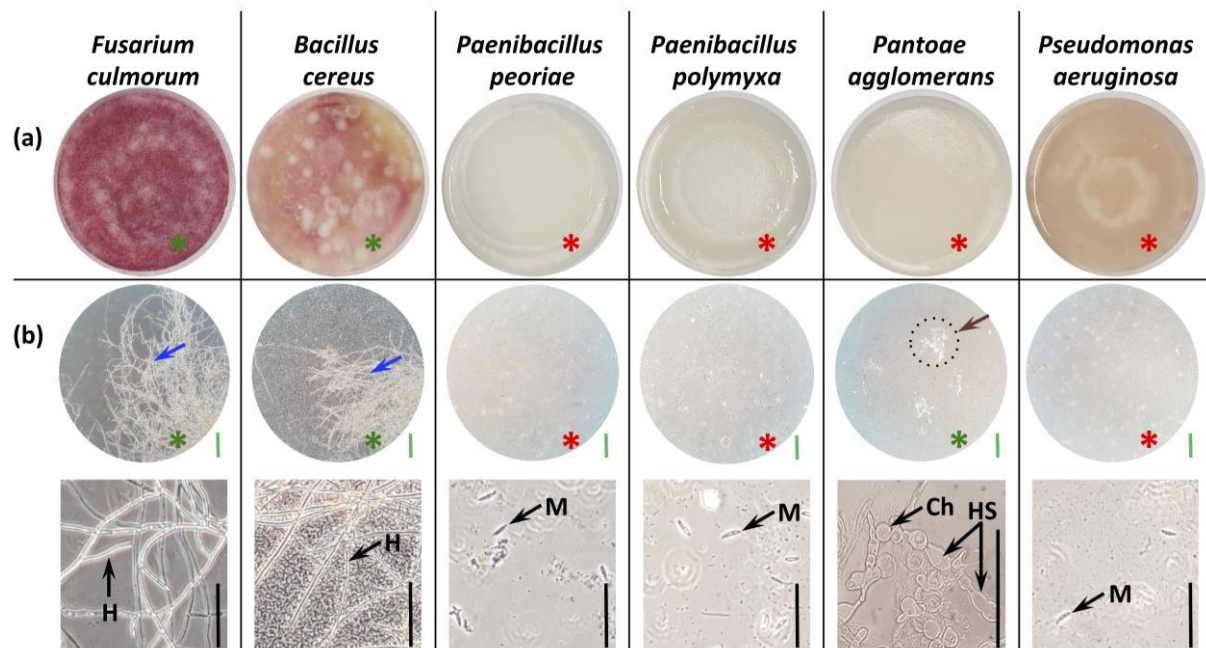
Conversely, the intracellular fractions of *P. aeruginosa* and *B. cereus* had no impact on hyphae, resulting in normal hyphal thickness comparable to controls. In contrast, the intracellular fraction of *P. agglomerans* led to misshapen hyphae characterized by swelling, septation, and the presence of chlamydospores (**Figs 9a and 9b**). These abnormal hyphal characteristics indicate an impairment in *F. culmorum*'s normal growth pattern and suggest that this strain exhibits fungicidal rather than fungistatic activity. Our finding is consistent with similar results demonstrating that *Pantoea dispersa* strongly inhibited the pathogenic fungus *Ceratocytis fimbriata* growth and spore germination causing dramatic breakage of its hyphae [152]. *Pantoea* species are known to be strong environmental competitors producing a wide range of naturally occurring substances with antibiotic activity such as phenazines, pantocins, and microcins [153,154].

Bacterial intracellular metabolites of *P. polymyxa*, *P. peoriae*, and *P. agglomerans* produced similar effects when applied as cell suspensions, suggesting the presence of the same or similar active compounds. The observed inhibition could also be mediated through secreted products, whose identity was not determined in this study. In the case of *P. aeruginosa*, the full inhibition of macroconidia germination was achieved only by the bacterial suspension, indicating that this total inhibitory effect requires direct cell-cell interactions.

As fungal germination depends on environmental pH and availability of nutrient such as carbon and nitrogen, total inhibition or reduced germination and hyphae development could be related to the modulation of these variables and/or nutrient uptake directly by bacterial cells that may enter into a competitive relationship and/or through their intracellular metabolites [155]. This result suggests that the intracellular metabolites of *P. polymyxa*, *P. peoriae*, and *P. agglomerans* characterized by their high effectiveness could be developed as potential biocontrol agents for *F. culmorum* diseases. However, the specific substances responsible for the observed inhibitory effect remain unknown, pending further research.



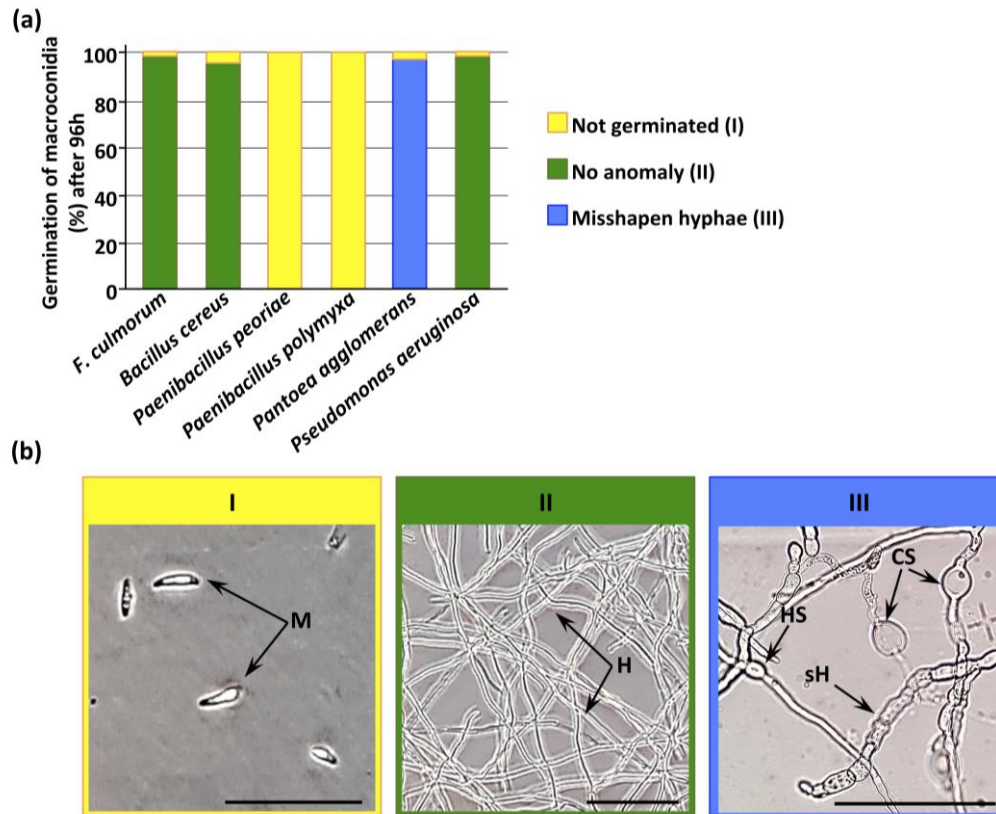
**Fig 6. Effect of culture filtrate of selected bacterial strains on *F. culmorum* mycelial growth after 7 days of incubation at 28°C.** Inhibition of the mycelial growth is expressed in % ± SE. Morphological differences between mycelium are highlighted by different colored arrows. Scale bars on photographs represent 1 cm.



**Fig 7. *F. culmorum* macroconidia germination in the presence of the selected bacterial strains after 5 days of incubation at 28°C.** (a) Macroconidia germination appearance on PDA (Petri dish surface side, Ø 8 cm). (b) Optical microscopic observation of macroconidia and hyphae. Green scale bar = 0.33 mm; Black scale bar = 0.1 mm. Red asterisk indicates no germination; Green asterisk indicates visible germination at visual and microscopic levels. Blue arrow for a dense mycelium; Brown arrow for a delayed and less well-developed mycelium. **M**: macroconidia, **Ch**: chlamydo-spore, **HS**: hyphal swellings, **H**: hyphae.

	<i>Control</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus peoriae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>6H</b>						
	$\%g = 82.7 \pm 4.63^a$ $Lh = 0.50 \pm 0.13^{ab}$	$\%g = 66.42 \pm 9.89^b$ $Lh = 0.52 \pm 0.14^{ab}$	$\%g = 0^c$ $Lh = 0^c$	$\%g = 0^c$ $Lh = 0^c$	$\%g = 64.04 \pm 5.68^b$ $Lh = 0.42 \pm 0.15^b$	$\%g = 62.58 \pm 5.71^b$ $Lh = 0.56 \pm 0.07^a$
<b>12H</b>						
	$\%g = 90.37 \pm 4.55^a$ $Lh = 1.67 \pm 0.47^a$	$\%g = 86.74 \pm 4.42^{ab}$ $Lh = 0.68 \pm 0.09^c$	$\%g = 0^c$ $Lh = 0^d$	$\%g = 0^c$ $Lh = 0^d$	$\%g = 85.06 \pm 4.49^b$ $Lh = 0.82 \pm 0.12^b$	$\%g = 88.26 \pm 3.92^{ab}$ $Lh = 1.59 \pm 0.53^a$
<b>24H</b>						
	$\%g = 94.05 \pm 5.18^a$ $Lh = 2.4 \pm 0.33^a$	$\%g = 91.1 \pm 2.55^a$ $Lh = 0.82 \pm 0.16^c$	$\%g = 0^b$ $Lh = 0^d$	$\%g = 0^b$ $Lh = 0^d$	$\%g = 92.68 \pm 2.63^a$ $Lh = 1.22 \pm 0.21^b$	$\%g = 94.72 \pm 2.63^a$ $Lh = 2.18 \pm 0.37^a$
<b>96H</b>						
	$\%g = 99.04 \pm 1.79^a$ $Lh = 5.06 \pm 0.4^a$	$\%g = 96.28 \pm 3.82^a$ $Lh = 3.26 \pm 0.45^b$	$\%g = 0^b$ $Lh = 0^d$	$\%g = 0^b$ $Lh = 0^d$	$\%g = 97.39 \pm 2.67^a$ $Lh = 1.98 \pm 0.44^c$	$\%g = 98.74 \pm 1.21^a$ $Lh = 3.13 \pm 0.53^b$

**Fig 8. Microscopic observation of *Fusarium culmorum* macroconidia germination after 6, 12, 24 and 96 h of exposure to intracellular metabolites of different selected bacterial strains at 28°C.** Red asterisks indicate no germination; green asterisks indicate germination and normal hyphal morphology; and purple asterisks indicate germination with misshapen hyphae. " $\%g$ " corresponds to the percentage of macroconidia germination; " $Lh$ " corresponds to length of hyphae (mm) per square (0.033 x 0.033 mm). Scale bar = 0.33 mm. Data correspond to the mean of a minimum of nine repetitions  $\pm$  SE. Different letters above data show significant differences within rows ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig 9. *F. culmorum* macroconidia germination and related cell structures after 96 h of exposure to rhizobacteria's intracellular metabolites. (a)** Rate of *F. culmorum*'s macroconidia germinated after exposure of intracellular metabolites of the five selected rhizobacteria. **(b)** Example of the microscopic morphologies of macroconidia, mycelia and chlamydospores of *F. culmorum* : **I**, not germinated; **II**, no anomaly; **III**, Misshapen hyphae. **M**, macroconidia; **H**, normal hyphae; **sH**, septate hyphae; **HS**, hyphal swelling; **CS**, Chlamydospores. Scale bars = 100  $\mu$ m.

## Root endophytes as molecular inducers of wheat growth and defense responses

### General considerations

Plant-microbe interactions dynamically affect both plant growth and health. The mechanisms underpinning these associations are primarily mediated by specialized host-derived metabolites (or elicitors) that can trigger rapid and extensive transcriptomic reprogramming. The plant response promotion experiments we conducted here through real-time PCR analyses revealed that seed inoculations with each endophyte rhizobacteria significantly modulated, 28 days after treatment, all selected genes involved in plant growth and defense accumulation in roots and leaves (**Fig 10, S2 Table**). These transcriptomic responses were characterized by inductions or inhibitions, which occurred over time post-inoculation, and systemically throughout the plant (under- and aboveground organs). In addition, the gene expressions seemed to be strain-dependent, with differential patterns that were intra-clade-dependent (e.g., *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Paenibacillus*). These transcriptomic responses highlight the complexity and richness of the interactions established between wheat root endophytes and wheat, which ultimately determine a myriad of molecular mechanisms involved in various physiological properties such as plant growth and innate immunity.

### Wheat growth-dependent molecular responses

PGP microbes directly enhanced plant growth by facilitating solubilization, mineralization and nutrient uptake, as well as the expression of a range of plant growth regulators and signaling molecules related to phytohormone production (e.g., abscisic acid-ABA, gibberellic acid-GA, indole-3-acetic acid-IAA, and, for present purposes, cytokinins-CK) [156]. CKs stimulate cell division and enlargement and shoot growth, and they induce stomatal opening under stress conditions (salinity or drought); they also play a vital role in delaying premature leaf senescence and death, and in enhancing plant stress tolerance [157,158]. Two genes related to the CKs-dependent signaling pathway seem to be involved in plant growth: the first, *IPT5*, encodes an adenosine phosphate-isopentenyltransferase isoform that catalyzes the synthesis of cytokinins by attaching an isopentenyl radical to the purine ring of adenine, and the second, *CKX*, encodes an isoform of cytokinin oxidase that catalyzes the irreversible oxidative degradation of CKs [159]. Our transcriptomic data showed that *IPT5* was induced (except with *P. polymyxa*, where it was slightly inhibited in both organs), whereas *CKX* was not significantly modulated or repressed, especially with *B. halotolerans*, *Rhizobium*, and *Variovorax*. These expression kinetics could be explained by the enzyme function encoded by these genes, and in this regard, *IPT5* and *CKX* profiles are consistent with the potential of plant growth promotion developed by the endophytes (**Fig 1**).

### Wheat innate immune-dependent molecular responses

Plant defense responses are driven by a complex coordinated induction of heterogeneous groups of phytohormones such as SA-, JA-, ET-signaling pathways, and transcription factors, which collectively orchestrate the cellular integration of environmental cues by initiating the local and systemic release of indigenous defense-related enzymes and secondary metabolites.

The crosstalk between the different hormonal networks is complex and literature reports are sometimes contradictory: the JA and ET signaling pathways are generally described as synergistic with each other, and antagonistic to the SA-dependent pathway. In addition, the SA pathway may be responsible for the systemic acquired resistance (SAR) and deliver resistance against biotrophic pathogens, and the JA/ET pathways may be responsible for the induced systemic resistance (ISR) and be associated with symbiont or necrotrophic pathogens [160]. Besides constituting the central regulatory network of plant immunity, these phytohormones interact with growth-related plant hormones, including cytokinins (CKs), themselves involved in the promotion of plant resistance to pathogens [161]. The modulation (including up- and/or down-regulation) of interconnected phytohormonal pathways is therefore likely to be a significant part of an overall effect of individual root endophytes on innate immune -and growth- performance we outline here.

Root endophytes engage several hormonal-signaling pathways to regulate the elicitation of plant disease resistance against a wide range of parasite- and pathogen-induced challenges [162]. In our molecular study, the modulation of defense responses observed in leaves and roots following the inoculation of the 14 root endophytes was coupled with the increased expression of various generic stress-related transcription factor (*WRKY3*, *EDS1*), of SA- and JA-responsive genes *NPR1* and *AOS*, respectively, together with reactive oxygen species (ROS)-associated genes *CAT*, *SOD* and *POD*. In addition, CKs may well be involved in the induction of the defense gene expression (PR-proteins, phytoalexin synthesis, and lignification processes), through the regulation of the SA-signaling pathways [162,163]. Nevertheless, the isolates suppressed, in leaves and roots, the expression of genes involved in the ethylene biosynthesis (aminocyclopropane (*ACC*) synthase (*ACS1*)), and the TF pathogen-induced ERF1 (*PIE1*) related to the ET-signaling pathway, which regulates the expression of second-order ET-dependent regulatory genes. Our data indicate that the strains upregulated the CKs, SA, and JA signaling pathways, but repressed the ethylene pathway. Synergistic overlap of SA-, JA-, and CK-signaling pathways seems to occur here, as is well described for some pathosystems. However, these patterns can be confusing, because SA- and JA/Et-dependent signaling pathways are often described as antagonistic. The role of each hormone, and their relationship to each other during relatively long time periods in the plant development cycle under the influence of beneficial microbial agents, is still not well understood. The synergistic action of SA- and JA-signaling pathways has already been described for some pathosystems, as has the suppression of the ET-signaling pathway by the root endophytes [164-166]. The inhibition of ethylene synthesis can be paralleled by another effect: during compatible interaction, it causes cell collapse both during PTI and disease development in plant tissues, thus helping the colonization of the host plant by the pathogens [167,168].

These complex cellular responses involve timely recognition of the invading pathogen by R proteins. In this regard, and in our study, two receptor-like kinases (RLKs), *WAK2* and *LRR-RLK*, showed abundance increases in leaves, possibly in relation with the systemic signals elicited by the SA-, JA- and ROS-signaling pathways from roots. In roots, *WAK2* was somewhat inhibited, whereas *LRR-RLK* was activated. The biochemical modalities related to their function of recognizing various exogenous factors are different [169,170], *WAK2* and *LRR-RLK* being described as conferring resistance against *F. culmorum* [171] and *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, respectively [172]. Their contrasting transcriptomic accumulation observed

in this study is plausibly related to the relationship that each root endophytes forms specifically with the plant host.

Subsequent plant responses to microbe recognition and phytohormone balance modulation events are associated with profound metabolic adjustments leading to the accumulation of several defensive substances. In the first line of defense induced early in a biotic interaction (including positive plant-beneficial microorganism interactions), plants produce reactive oxygen species (ROS), viz. superoxide anion radicals ( $O_2^{\circ-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radicals ( $OH^{\cdot}$ ), singlet oxygen ( $O_2^1$ ), and alkoxy radicals (ROs). ROS are formed as by-products of various metabolic pathways localized in different cellular compartments. In an interaction biotic context involving pathogens as well as symbionts or beneficial agents, ROS production can be enhanced in the apoplast, responsible for oxidative stress. Several enzymes are responsible for this massive and sudden ROS production, including the class III peroxidases (POD). PODs are redox enzymes that trigger the biosynthesis and the oxidation of phenolic compounds that integrate the wall-building processes (lignification) of host plant cells during the defense reaction against pathogenic agents. As such, members play an active role in ROS homeostasis in plant-microbe interactions and hold a key position in plant defense against pathogens [173], including in wheat [174]. However, an increase in ROS levels in plants above a certain threshold (also called an oxidative burst), leads to severe disruption of proteins, peroxidation of membrane lipids, which results in decreased fluidity and fracturing of the membranes, and DNA/RNA damage. The combination of all these spontaneous chemical reactions impairs the normal functioning of plant cells, leading eventually to cell collapse or hypersensitive reaction (HR) corresponding to incompatible interaction [175]. Plant ROS are powerful weapons against pathogens, and to protect against the non-selective harmful effects of superoxide and  $H_2O_2$  (and therefore preventing the initiation of the Haber-Weiss reaction leading to hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) radical generation) plants are armed with antioxidant defense systems both non-enzymatic (e.g., ascorbate, glutathione, flavonols, tocopherols) and enzymatic such as catalases (CAT), superoxide dismutase (SOD), and Foyer-Halliwell-Asada (or ascorbate-glutathione) cycle [176]. These enzymes are usually co-expressed and play a crucial role in the mitigation of ROS toxicity. It has been reported that some root endophytes (and PGPRs), including *B. thuringiensis*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, and *Pseudomonas mendocina*, increase the activity of antioxidant enzymes in wheat, tomato, mung bean, and lettuce, respectively. Our results showed a significant increase in CAT and SOD gene expressions (except for *Rhizobium* sp. in roots), and for POD, except for *Achromobacter* sp., *E. hormaechei*, *P. frederiksbergensis*, and *V. paradoxus*, where POD modulations were not significant, and with *Rhizobium* sp., which drastically repressed the POD gene expressions.

The modulation in the POD, SOD, and CAT expressions indicates the existence of an oxidative stress that is either still ongoing but at very low levels or has been resolved with the enzymatic systems still on alert in roots and leaves. Anyway, Whichever the case, PGPRs induced a systemic strengthened antioxidant system for ROS removal. It is of note that the increased activities of antioxidant enzymes in the root endophyte-inoculated wheat probably enhanced plant growth observed in **Fig 2**, by eliminating the free radicals and maintaining efficient photosynthetic rates and N uptakes (**Fig 2**), and plausibly cellular redox potential and membrane integrity. These findings are in close agreement with others reported with various biocontrol agents [177-179].



Another generic stress marker is the heat shock protein 70 (HSP70), upregulated by pathogen-induced signaling pathways, notably in wheat (named *TaHSC70*) [180,181]. HSP70 is an evolutionarily conserved family of proteins typically localized in the cytosol and various organelles. Members may function as molecular chaperones, playing roles in protein transport and assembly processes. They may thus be recruited for folding and refolding of nonnative proteins to prevent irreversible aggregation of stress-denatured proteins, notably under the action of ROS produced during the incompatible interactions, thus preserving cellular homeostasis [182,183]. In our transcriptomic study, *Hsp70* was upregulated, except for the two *Paenibacillus* species and *Rhizobium* sp. in roots, where abundances were downregulated. Interestingly, these modulations correlate with the kinetics of ROS-scavenging enzymes, knowing that HSP70 plays a crucial role in maintaining cell integrity in a prooxidative context. Furthermore, *HSP70* expression is co-regulated with the expression of genes related to hormonal balances: for instance, HSP70 expression correlates with that of *IPT5* in leaves (but not in roots), which is involved in the CKs-signaling pathway, the *allene oxide synthase (AOS)* gene, whose related enzyme is involved in the JA production and whose expressions were upregulated in roots and leaves, and the *non-expresser of pathogenesis related 1 (NPR1)* gene, whose related proteins are master regulators of SAR induced by SA and JA, and for which transcript accumulations were upregulated in both organs (except for the two *Paenibacillus* species in roots with downregulations). The interactions between the HSPs and most phytohormones and ROS have been extensively studied in many plant species [184], and the expression trends observed here support our hypothesis concerning the HSP family's involvement in the positive interactions that PGPRs initiate with their hosts.

However, there arises the question of the diffusion of ROS, in particular  $H_2O_2$ . This small molecule is uncharged and relatively long-lived. These specific physico-chemical features enable it to spontaneously cross membranes. In infinitesimal amounts, it is a suitable candidate to provide a secondary messenger role, integrating the complex phytohormonal balances that regulate multiple physiological pathways in plants [185]. This key mediating role also involves the intervention of specific transmembrane channels, called peroxyporins, whose role is to finely control its diffusion [186]. Peroxyporins are specific aquaporins of the MIP family, such as certain PIPs (plasma membrane intrinsic proteins). However, despite their primordial role in the diffusion of the second messenger  $H_2O_2$ , peroxyporins have not been studied in PGPR-treated plants. In our study, the increased abundance of *AQP* transcripts (belonging to the PIP group) correlates with those of *CAT*, *POD* and *HSP70*, reflecting a plausible role for PIPs in the root endophyte-induced  $H_2O_2$ -signaling pathway. All these positive gene co-regulations point to *HSP70* and *AQP* being involved in basal defense through complex interconnections between CK-, SA- JA-, and  $H_2O_2$ -dependant signaling pathways (as is commonly observed with classical defense markers such as *CAT*, *SOD* and *POD*), which are triggered by the interaction of the wheat plant with the root endophytes, and which persist systemically over time. Finally, these observations confirm that these proteins are an integral part of plant immunity and participate in PTI responses that can be initiated by beneficial microorganisms such as root endophytes and PGPRs, as is also observed with interactions involving phytopathogens [187,188].

In tandem with pro-oxidant compounds, some root endophytes are known to significantly induce the accumulation of a wide range of specialized host-derived secondary metabolites that are potentially

antioxidant and/or toxic to microorganisms, such as phenylpropenes, terpenes, and pathogenesis-related proteins.

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) is the primary entry enzyme of the shikimic acid pathway, which regulates biosynthesis of low-molecular-weight phenolic compounds, such as cinnamic, coumaric, and caffeic acids, flavonoids, tannins, and lignins [189]. This molecular family is remarkably diverse and widely distributed in the plant kingdom. It includes the flavonoids, a richly varied group, of which almost all subgroups have the capacity to act as antioxidants and/or biopesticides (or phytoalexins), regulating both plant development and the interaction with microbes regardless of their trophic modalities (commensal, pathogenic or beneficial) [190]. In addition, PAL degrades *L*-phenylalanine to *trans*-cinnamic acid, integrating the biosynthesis of SA to induce the defense responses [191]. In our study, most root endophytes elicited *PAL* expression in roots and leaves, except for *V. paradoxus*, which repressed it in both organs. Correlated with this gene expression, leaf epidermal flavonol accumulation increased slightly in some wheat strains, including *B. megaterium*, *P. agglomerans*, and *Rhizobium* sp. (Fig 2). These molecular ecophysiology data are congruent with many studies that have demonstrated that flavonoids are key active chemicals that participate in the mediation of communication networks between rhizobacteria and plants [192,193]. The accumulation of these phenolics maximized the tolerance of wheat against salinity and drought events when inoculated with *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas mendocina*, *Arthobacter* sp., *Halomonas* sp., and *Nitrincola lacsaponensis* [194]. Root endophytes (and PGPRs) play a significant role in initiating the plant's induced systemic tolerance (IST) to various abiotic stresses, which constitutes the basis of eco-friendly stress management to enhance plant tolerance to major environmental cues that are amplified by general climate change (such as salt, drought, and nutrient deficiency or excess). These promising potentials will be further studied in future research on the best performing PGPRs isolated in this work.

Besides these small secondary metabolites, plants synthesize proteins with potential intrinsic toxic properties. This concerns pathogenesis-related (PR) proteins (PRPs) and small antimicrobial peptides. These proteins are small, mostly acidic, resistant to breakdown, and most commonly found in intercellular spaces. The biochemical activities of these markers have been reported to interfere with membrane integrity and/or to degrade cell walls of the pathogens [195]. They are among the major preliminary proteins accumulated as molecular defensive barriers against biotic agents, substantially limiting the degree of pathogenic microorganism invasion and spread throughout the plant. Our transcriptomic analyses show that the isolated rhizobacteria significantly elicited the expression of several of these candidates (*PR-1*, *PR-5*, *POD*, *thionin*). The upregulation of PRPs in tandem with the accumulation of the low molecular-weight phenolic compounds reflect the rhizobacteria's ability to trigger the plant's innate immune performances efficiently and systemically.

Several defense-encoding genes showed more complex regulations, being either weakly modulated or significantly inhibited by some rhizobacteria, in roots and/or in leaves. Full inhibitions were observed with *polyphenol oxidase* (*PPO*, a copper-containing metalloprotein that catalyzes the oxidation of phenolic compounds to quinones, making them more toxic to microorganisms than the original phenolic compounds), and the antimicrobial *LTP* (lipid transfer protein) and *PR-17*. Contrasting modulations

between organs were observed (i.e., upregulation vs. downregulation), with the *glucan synthase-like 22* (*GSL22*, involved in the callose synthesis), as well as the *glycine-rich protein* (*GRP*, small antibacterial and antifungal proteins) and the two classes of antimicrobial PRs *PR-1*, and *PR-13 sulfur-rich thionin-like*. It also concerns some strain-specific modulations, with *PR-5* (which encodes the antimicrobial thaumatin-like protein), and *sesquiterpene synthase* (*SQTS*, which encodes the key enzyme of the mevalonate pathway involved in the synthesis of antimicrobial sesquiterpenes). It is highly plausible that the activity of these substances interferes with an optimal development of endophytes on wheat roots. The potential tolerance of root endophytes after their recognition by plants depends, *inter alia*, on their ability to suppress and/or detoxify specific plant defenses, and to protect their own vital cellular functions, the same ones that would be directed against pathogenic agents. The elicitation of these defenses is generally governed by SA- and JA-dependent signaling pathways, both of which appear to be elicited by the root endophytes isolated in our study. The fact that the negative modulation of these defenses is desynchronized from that of phytohormonal stress networks implies that beneficial microbes need to suppress specific local immune responses in the host, and that the regulation of these genes remains under the full control of PGPRs [196]. These singular transcriptomic data, albeit counterintuitive in a context of potentiated immune performance, echo the fact that specific defense-encoding PR proteins or those involved in the defensive secondary metabolisms can be modulated lower in resistant cultivars than in those prone to pathogen infection, and that overexpression/silencing of certain pathogenesis-related genes impairs or enhances resistance to various diseases [197-199]. The fact that certain defense genes are transcribed does not systematically result in an accumulation of related products. For example, a common response of plants to fungal infection is the elicitation of *GSL22*, which by polymerizing the units of (1,3)- $\beta$ -glucan together, allows the accumulation of callose at the site of infection by the pathogen, a form of cell wall thickening called papillae. The fact that the *GSL22* gene is significantly activated in leaves does not reflect a generalized cell wall strengthening of this organ, but a probable set-up of a durable and systemic transcriptomic defense arsenal that would be deployed more rapidly and more strongly in a situation of opportunist infections. This is reminiscent of the priming phenomenon [200] known to be elicited by beneficial organisms [201-203]. Priming is a durable physiological response, and it maintains, throughout the plant life cycle, an efficient immunity status against various stressors at no associated developmental cost to the plant, as was observed in our biological conditions with rhizobacteria (PGPR)-treated plants that exhibit similar or higher root and aerial growths as controls (Fig 2). In this light, the valorization of several new PGPR endophytes isolated in this study as priming plant defense inducers to combat biotic and abiotic stresses will contribute to promising and sustainable new eco-friendly strategies to improve better protection and management of field crops [204,205].

**Fig 10. Quantitative real-time RT-PCR of selected genes related to plant growth (growth modulators) and innate immunity (recognition and transduction of signals, pathogenesis-related proteins, secondary metabolisms, oxidant stress and fluxes, phytohormone balances).** Transcript abundances were recorded in leaf and root tissues of wheat (cv. Karim) at 28 days after seed inoculation with PGPR (10<sup>8</sup> CFU / mL). Transcript abundances of the genes were recorded by real-time *q*RT-PCR analyses in the PGPR-infected plants and were relative to those of the control using the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. The significant differences were statistically analyzed based on three independent biological replications. Each biological repetition corresponds to a mix of five plants (Tukey's test, adjusted *p* < 0.05). Complete statistical data, including the *SE*, are detailed in S2 Table. Colors represent level of transcriptional expressions (blue: up-expression; red: down-expression).

Gene	Growth modulators		Recognition and transduction of signals										Pathogenesis-related proteins																				
	Leaf	Root	WAKG	LRR-RLK	EDSI	MAPK3	MAPK3	NPR1	PR1	CHT	PRS	POD	DEF	THIO	PR17	WAKG	LRR-RLK	EDSI	MAPK3	MAPK3	NPR1	PR1	CHT	PRS	POD	DEF	THIO	PR17					
Achromobacter sp	-0.11	0.30	1.80	-2.15	1.51	-2.00	2.69	0.88	0.63	0.12	0.83	0.71	1.75	1.71	-0.02	-0.98	2.16	1.91	0.20	-0.13	-0.27	-0.99	3.85	6.07	-2.43	-2.19	3.85	6.07	-2.43	-2.19			
Bacillus cereus	3.08	-0.72	2.45	-1.49	1.83	-1.66	1.35	0.95	0.70	0.72	0.66	1.24	1.55	1.25	0.04	0.74	2.41	2.15	0.89	1.86	1.47	-0.58	-1.12	3.28	-4.93	-1.06	-1.14	3.28	-4.93	-1.06	-1.14		
Bacillus halotolerans	0.36	0.05	-0.58	-0.34	2.51	-1.03	3.08	2.15	2.16	1.61	1.37	1.24	1.33	2.82	0.67	1.33	0.94	0.37	0.31	2.62	0.14	-0.49	-0.81	3.31	-3.42	-0.76	-1.66	3.31	-3.42	-0.76	-1.66		
Bacillus megaterium	-0.21	0.12	-1.32	-0.93	1.56	-0.61	1.86	1.94	0.88	0.77	0.72	1.11	0.84	0.67	0.67	0.40	0.44	0.22	0.27	-0.03	0.59	-0.41	-0.41	2.10	3.98	-1.83	-1.00	2.10	3.98	-1.83	-1.00		
Bacillus moljavensis	1.18	0.80	-0.74	-0.72	1.88	-1.39	1.56	0.80	1.33	0.39	1.01	0.83	1.60	1.34	-0.22	0.84	0.30	1.10	0.56	0.83	1.18	1.07	-1.00	-1.38	1.13	-2.47	-0.56	-1.59	-2.47	-0.56	-1.59		
Bacillus subtilis	1.22	-0.19	-0.74	-0.72	1.88	-1.39	1.56	0.80	1.33	0.39	1.01	0.83	1.60	1.34	-0.22	0.84	0.30	1.10	0.56	0.83	1.18	1.07	-1.00	-1.38	1.13	-2.47	-0.56	-1.59	-2.47	-0.56	-1.59		
Enterobacter	2.41	-0.12	-0.97	-0.61	1.44	-2.34	2.03	0.74	0.73	0.44	1.10	0.22	1.00	1.82	2.70	1.07	0.38	3.37	1.99	0.06	-0.09	0.16	0.04	0.04	3.27	-4.56	-0.75	-1.92	3.27	-4.56	-0.75	-1.92	
Paenibacillus peoriae	1.74	0.01	-0.53	-1.50	1.75	-1.86	3.13	2.63	1.08	0.79	0.09	0.15	0.19	0.28	-0.77	0.79	0.38	1.87	1.78	1.82	0.12	-1.65	-1.76	0.84	-3.12	-2.07	-2.09	0.84	-3.12	-2.07	-2.09		
Paenibacillus polymyxa	1.95	-0.17	-0.92	-0.19	2.12	-3.59	1.35	1.44	0.79	0.68	0.27	0.41	0.36	0.47	-0.99	0.43	0.53	1.55	1.90	0.90	1.35	-1.05	-0.24	1.16	-2.35	-2.96	-1.37	1.16	-2.35	-2.96	-1.37		
Pantoea agglomerans	2.58	-0.73	-0.70	-0.15	2.14	-1.06	2.62	3.34	0.55	0.50	1.00	1.14	1.33	1.39	1.37	1.74	0.39	0.54	0.72	0.52	1.43	0.52	0.80	0.34	2.02	-2.78	0.16	-0.28	2.02	-2.78	0.16	-0.28	
Pseudomonas	-0.52	-1.18	-0.86	-0.57	1.34	-2.37	0.82	1.19	1.55	1.25	0.91	0.68	1.24	1.31	0.28	-1.04	0.70	1.07	1.90	2.55	2.35	1.08	-0.94	-1.65	2.33	-3.31	-0.72	-1.16	2.33	-3.31	-0.72	-1.16	
Pseudo-frederiksbergae	2.94	-0.16	-0.82	-1.12	-0.23	-0.92	1.41	1.16	1.16	0.97	0.35	0.81	1.38	1.92	-1.74	0.56	0.63	1.85	1.26	1.26	0.38	0.05	-0.90	-0.15	1.92	-3.87	-1.35	-1.92	1.92	-3.87	-1.35	-1.92	
Rhizobium	1.19	0.14	-1.07	-1.46	-0.90	-3.24	0.79	1.79	1.37	0.29	0.32	0.07	1.38	1.48	1.66	2.37	1.74	0.95	-0.53	-0.63	-1.06	-1.05	-0.74	0.83	0.28	-0.43	-2.20	0.28	-0.43	-2.20	0.28	-0.43	-2.20
Variovorax paradoxus	0.81	-0.14	-1.46	-0.90	0.79	-3.25	0.37	3.01	0.44	0.54	0.20	0.96	1.32	1.88	0.38	1.74	0.20	2.11	1.25	1.25	-0.07	-0.24	-0.44	0.20	2.97	-2.72	-0.50	2.97	-2.72	-0.50	2.97	-2.72	-0.50

Gene	PAL		PPO		SQT5		GSL22		GRP		LTP		HSP70		CAT		SOD		AQP		ACS1		PIE		AOS		LOX		
	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root	
Achromobacter sp	0.26	1.27	-0.71	-1.83	4.34	2.67	1.58	-1.27	0.76	-0.37	1.62	1.52	0.77	0.73	1.36	0.48	1.02	0.94	0.95	-1.17	-0.73	-2.65	-2.05	0.15	0.31	1.46	0.60	-0.58	
Bacillus cereus	0.77	0.55	-0.57	-2.18	3.71	-0.37	0.76	-1.33	0.87	-0.34	3.09	2.42	1.11	0.95	1.46	0.91	2.49	0.82	1.05	-1.43	-0.95	-1.06	-0.94	0.73	0.84	0.60	-1.68		
Bacillus halotolerans	0.87	0.73	-0.45	-1.38	4.79	-0.36	1.38	-1.26	1.74	-0.43	2.04	2.20	1.08	1.10	2.46	0.33	1.78	1.17	0.59	-0.35	-0.13	-1.40	-1.39	1.57	0.75	1.77	-1.33		
Bacillus megaterium	0.36	1.05	-2.44	-1.53	1.48	-0.29	0.84	-1.24	1.45	-0.49	1.29	1.26	1.45	1.16	1.88	0.71	1.59	0.39	1.17	-0.70	-0.42	-1.92	-1.12	1.47	1.73	1.06	-1.68		
Bacillus moljavensis	1.50	1.00	-1.37	-1.86	1.50	-0.43	1.41	-1.02	1.67	-0.84	0.74	1.14	0.59	0.74	1.79	0.20	1.14	0.76	0.77	1.44	-0.75	-0.92	-1.19	-1.26	0.90	1.70	1.02	-0.57	
Bacillus subtilis	0.66	0.87	-1.68	-1.75	1.50	-0.23	2.25	-0.38	1.35	-0.78	0.99	1.13	0.73	0.87	1.27	1.15	2.30	1.34	1.41	1.20	-0.38	-0.99	-1.19	-0.91	1.28	1.55	0.77	-2.38	
Enterobacter	0.51	0.96	-0.79	-2.28	4.69	0.24	0.89	-1.00	1.09	-1.02	-1.09	-0.69	0.82	0.42	1.15	0.84	2.92	1.96	0.84	1.11	-1.24	-1.12	-1.27	-1.51	0.89	0.83	0.79	-1.58	
Paenibacillus peoriae	2.43	0.71	-2.34	-1.69	-1.13	-1.34	1.50	-1.40	0.79	-0.95	-0.72	-0.57	0.98	0.39	1.47	0.46	1.30	1.48	1.10	0.91	-0.25	-1.32	-0.73	-1.95	0.73	1.22	0.82	-1.27	
Paenibacillus polymyxa	0.92	1.33	-1.64	-1.75	-0.96	-1.68	1.21	-1.22	1.01	-0.67	-1.21	-0.89	0.80	1.12	2.04	0.96	3.95	2.27	0.52	0.98	-1.33	-1.08	-1.26	-2.10	0.21	0.17	0.43	-2.23	
Pantoea agglomerans	1.69	1.46	-0.56	-0.90	3.32	0.92	1.22	-1.05	1.20	-0.67	1.16	2.58	0.88	1.32	1.52	1.21	0.90	2.67	0.79	1.66	-0.33	-1.10	-0.69	-0.99	1.40	1.01	1.76	-1.90	
Pseudomonas	1.61	1.16	-1.57	-2.33	1.56	-1.24	1.15	-0.81	1.58	-1.13	1.05	0.88	1.48	0.85	2.04	1.16	0.85	0.87	0.86	1.17	-0.17	-0.79	-0.68	-1.31	1.71	0.61	2.48	-1.52	
Pseudo-frederiksbergae	0.68	0.71	-2.05	-2.20	2.50	-1.73	1.00	-1.04	1.07	-0.67	1.78	2.29	1.38	1.12	1.35	1.11	0.82	1.16	1.04	1.17	-0.59	-0.64	-0.69	-0.94	0.98	0.49	3.22	-1.64	
Rhizobium	1.07	-2.71	-2.19	-1.67	1.67	4.28	0.56	-2.03	-0.81	-1.35	1.85	2.19	1.38	0.79	1.72	-1.29	3.44	1.41	0.33	1.09	-0.63	-2.45	-0.69	-1.24	0.10	1.99	0.95	3.22	-1.64
Variovorax paradoxus	-0.35	-0.64	-1.18	-1.94	3.94	3.05	0.43	-1.29	0.57	-0.58	1.32	1.29	0.39	0.67	1.54	1.00	2.66	2.11	0.49	1.21	-1.74	-0.99	-1.18	-1.61	0.90	2.28	1.42	2.60	

**Transcriptional expression profile**



## Conclusion

In this study, 14 bacterial endophytes isolated from healthy wheat roots significantly improved shoot and root biomass accumulation in wheat seedlings and triggered the plant's innate immune responses by stimulating the expression of various defense-encoding genes under greenhouse conditions. *In vitro*, the isolates showed several plant growth-promoting traits, including the production of indole-related compounds, ammonia, and HCN, and the solubilization of phosphate and zinc. The strains also showed positive results for the production of extracellular enzymes, such as catalase, amylase, protease, pectinase and cellulase, which are important for mitigating stress. To control *F. culmorum*, three isolates, identified as *Pantoea agglomerans*, *Paenibacillus peoriae*, and *Paenibacillus polymyxa*, demonstrated strong antagonistic properties *in vitro*. They exhibited a remarkable capacity to inhibit mycelium growth, sporulation, macroconidia germination, and germ tube length of *F. culmorum*, suggesting potential use as an alternative to chemical treatments while promoting plant growth. All these exploratory results are promising, but further experimental work is now needed to gain a better understanding of the efficacy of these strains under field conditions.

## References

1. Evangelisti S, Lettieri P, Borello D, Clift R. Life cycle assessment of energy from waste via anaerobic digestion: a UK case study. *Waste management*. 2014; 34(1): 226-237.
2. Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology*. 2008; 11(4): 443-448.
3. Marella S. Bacterial endophytes in sustainable crop production: Applications, recent developments and challenges ahead. *International Journal of Life Sciences Research*. 2011; 2: 46-56.
4. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 2006; 19: 827-37.
5. Zhao K, Penttinen P, Guan T, et al. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Curr Microbiol*. 2011; 62(1): 182-90.
6. Berendsen RL, Pieterse CMJ, Barker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 2012; 17: 478-486.
7. Zamioudis C, Pieterse CMJ. Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012; 25: 139-150.
8. Panwar M, Tewari R, Nayyar H. Microbial consortium of plant growth-promoting rhizobacteria improves the performance of plants growing in stressed soils: an overview. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J, editors. *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Springer International Publishing Switzerland; 2014. pp. 257-285.
9. White JF, Kingsley KL, Zhang Q, et al. Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Management Science*. 2019; 75(10): 2558-2565.
10. Hardoim PR, Van Overbeek LS, Van Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. 2008; 16: 463-71.
11. Porrás-Alfaro A, Bayman P. Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*. 2011; 49: 291-315.
12. Zhang W, Liu D, Liu Y, et al. 2012. Overuse of phosphorus fertilizer reduces the grain and flour protein contents and zinc bioavailability of winter wheat. *J. Agric. Food Chem*. 65(8): 1473-1482.
13. Rastoin JL, Benabderrazik EH. 2014. Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb : Pour un co-développement de filières territorialisées, Ipemed, Col. « Construire la Méditerranée », Paris, pp 136.
14. Ammar K, Gharbi MS, Deghais M. Wheat in Tunisia. In: *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding*. Lavoisier. 2011; 2: 443-463.
15. Ben Hamouda M, Ben Youssef S, Bedhief S, et al. Status of Agricultural Innovations, Innovation Platforms, and Innovations Investment in Tunisia. PARI project country report: Republic of Tunisia. *Forum for Agricultural Research in Africa*. 2016; 21-25.
16. Valente J, Gerin F, Le Gouis J, et al. 2020. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant, Cell and Environment*. 43 (1): 246-260.
17. Wiese MV. *Compendium of Wheat Diseases*; The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, 1987; 112p.
18. Gargouri S, Hajlaoui MR, Guermech A, Marrakchi M. Identification des espèces fongiques associées à la pourriture du pied du blé et étude de leur répartition selon les étages bioclimatiques en Tunisie. *Bull. OEPP/EPPO Bull*. 2001; 31: 499-503.
19. Scherm B, Balmas V, Spanu F, et al. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*. 2013; 14: 323-341.

20. Khemir E, Chekali S, Moretti A, et al. Survival of *Fusarium culmorum*, causal agent of foot and root rot of cereals, on wheat, barley and oat residues in Tunisia. *Ann. L'INRAT*. 2018; 91: 162-172.
21. Giorgi, F. Climate change hot-spots'. Adaptation to climate change: Development of a national strategy for agriculture, ecosystems and water resources in Tunisia 2005 to December. *Geophysical Research Letters*. 2007; 33: 707-715.
22. Hellin, P, Scauflaire, J, VanHese, V, et al. Sensitivity of *Fusarium culmorum* to triazoles: impact of trichothecene chemotypes, oxidative stress response and genetic diversity. *Pest Management Science*. 2016; 73: 1244-1252.
23. Pedrero-Méndez A, Insuasti HC, Neagu T, et al. Why is the correct selection of *Trichoderma* strains important? The case of wheat endophytic strains of *T. harzianum* and *T. simmonsii*. *Journal of Fungi*. 2021; 7: 1087.
24. Zadoks JC, Chang TT, Konzak, CF. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 1974; 14: 415-421.
25. Hameed S, Yasmin S, Malik KA, et al. Rhizobium, Bradyrhizobium and Agrobacterium strains isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*. 2004; 39: 179-185.
26. Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28: 1942-1946
27. Saadaoui M, Faize M, Bonhomme L, et al. Assessment of Tunisian *Trichoderma* Isolates on Wheat Seed Germination, Seedling Growth and *Fusarium* Seedling Blight Suppression. *Microorganisms*. 2023; 11: 1512.
28. Bhardwaj A, Sharma D, Jadon N, Agrawal PK. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Archives of Clinical Microbiology*. 2015; 6: 1.
29. Mahfooz M, Dwedi S, Bhatt A, et al. Evaluation of Antifungal and Enzymatic Potential of Endophytic Fungi Isolated from *Cupressus torulosa* D. Don. *International journal of current microbiology and applied sciences*. 2017; 6: 4084-4100.
30. Slama, H. B, Cherif-Silini, H, Chenari Bouket, A, Qader, M, Silini, A, Yahiaoui, B, ... & Belbahri, L. (2019). Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in microbiology*, 9: 3236.
31. Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiology*. 1951; 26: 192-195.
32. Gilbert S, Xu J, Acosta K, et al. Bacterial Production of Indole Related Compounds Reveals Their Role in Association Between Duckweeds and Endophytes. *Frontiers in Chemistry*. 2018; 6: 265.
33. Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 1948; 17: 362-370.
34. Cappucino JC, Sherman N. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 4th ed. Benjamin/Cumming Pub. Co, New York. Nitrogen cycle; 1992; pp. 311-312.
35. Fasim F, Ahmed N, Parsons R, Gadd GM. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery *FEMS Microbiology Letter*. 2002; 213: 1-6.
36. Sharma P, Kunawat KC, Kaur S, Kaur N. Assessment of zinc solubilization by endophytic bacteria in legume rhizosphere. *Indian Journal of Applied Research*. 2014; 4: 439-441.
37. Castric KF, Castric PA. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983; 45: 700-702.
38. Al-Mutar DMK, Alzawar NSA, Noman M, et al. Suppression of fusarium wilt in watermelon by *Bacillus amyloliquefaciens* DHA55 through extracellular production of antifungal Lipopeptides. *Journal of Fungi*. 2023; 9(3): 336.

39. Han Z, Wang J, Ding Y, et al. New Observation in Biocontrol of *Penicillium caperatum* against *Fusarium oxysporum* on *Saposhnikovia divaricata* and as a Plant Growth Promoter. *Fermentation*. 2023; 9(4): 361.
40. Semighini CP, Murray N, Harris SD. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS microbiology letters*. 2008; 279(2): 259-264.
41. Bruisson S, Zufferey M, L'Haridon F, et al. Endophytes and epiphytes from the grapevine leaf microbiome as potential biocontrol agents against phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 2726.
42. Fernandez, M.R, Chen, Y. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Disease*. 2005, 89: 164–169.
43. Patel A, Sahu KP, Mehta S, et al. New Insights on Endophytic Microbacterium-Assisted Blast Disease Suppression and Growth Promotion in Rice: Revelation by Polyphasic Functional Characterization and Transcriptomics. *Microorganisms*. 2023; 11(2): 362.
44. Goulas Y, Cerovic ZG, Cartelat A, Moya I. Dualex: A new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics*. 2004; 43: 4488-4496.
45. Ben Amira M, Lopez D, Triki AM, et al. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control*. 2017; 110: 70-78.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408.
47. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online : URL <https://www.R-project.org/>
48. Tomczak M, Tomczak E. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. *Trends in Sport Sciences* 2014; 1: 19-25.
49. Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993; 64: 253-260.
50. Harba M, Jawhar M, Arabi MIE. In vitro antagonistic activity of diverse *Bacillus* species against *Cochliobolus sativus* (Common root rot) of barley. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 2020; 55(1): 35-42.
51. Comby M, Lacoste S, Baillieul F, Profizi C, Dupont J. Spatial and temporal variation of cultivable communities of co-occurring endophytes and pathogens in wheat. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 403.
52. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnostics*. 2001; 6: 313-321.
53. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtschuk P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1992; 42: 166-170.
54. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(9): 2761-2764.
55. Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. 2007; 44: 1108-1114.
56. Shade A, Stopnisek N. Abundance-occupancy distributions to prioritize plant core microbiome membership. *Current Opinion in Microbiology*. 2019; 49: 50–58.
57. Kuzniar A, Włodarczyk K, Grzadziel J, et al. Culture-independent analysis of an endophytic core microbiome in two species of wheat: *Triticum aestivum* L.(cv. 'Hondia') and the first report of microbiota in *Triticum spelta* L. (cv. 'Rokosz'). *Systematic and Applied Microbiology*. 2020; 43: 126025.



- 58.** Kumar A, Kumar A, Devi S, et al. Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: An in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*. 2012; 4: 1-5.
- 59.** Mahapatra S, Rayanoothala P, Solanki, MK, Das S. 2020. Wheat microbiome: present status and future perspective, in *Phytobiomes: Current Insights and Future Vistas*, eds M. Solanki, P. Kashyap, and B. Kumari (Singapore: Springer).
- 60.** Bhattacharyya P, Jha D. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012; 28(4): 1327-1350.
- 61.** Verma P, Suman A. Wheat microbiomes: ecological significances, molecular diversity and potential Bioresources for sustainable agriculture. *EC Microbiology*. 2018; 14(9): 641-665.
- 62.** Hassan TU, Bano A. Role of carrier-based biofertilizer in reclamation of saline soil and wheat growth. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2015; 61(12): 1719-1731.
- 63.** Zahir ZA, Arshad M, Frankenberger WT. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*. 2003; 81: 97-168.
- 64.** Khalid A, Arshad M, Zahir Z. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 96(3): 473-480.
- 65.** Rashad EM, Shaheen DM, Al-Askar AA, et al. Seed endophytic *Achromobacter* sp. F23KW as a promising growth promoter and biocontrol of *Rhizoctonia* root rot of fenugreek. *Molecules*. 2022; 27(17): 5546.
- 66.** Gao JL, Khan MS, Sun YC, et al. Characterization of an Endophytic Antagonistic Bacterial Strain *Bacillus halotolerans* LBG-1-13 with Multiple Plant Growth-Promoting Traits, Stress Tolerance, and Its Effects on Lily Growth. *BioMed Research International*. 2022; 5960004.
- 67.** Mageshwaran V, Gupta, R, Singh, S, et al. Endophytic *Bacillus subtilis* antagonize soil-borne fungal pathogens and suppress wilt complex disease in chickpea plants (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Microbiology*. 2022; 13: 994847.
- 68.** Mutungi PM, Wekesa VW, Onguso J, et al. Culturable bacterial endophytes associated with shrubs growing along the draw-down zone of Lake Bogoria, Kenya: assessment of antifungal potential against *Fusarium solani* and induction of bean root rot protection. *Frontiers in Plant Science*. 2022; 12: 796847.
- 69.** Yuan L, Jiang H, Jiang X, et al. Comparative genomic and functional analyses of *Paenibacillus peoriae* ZBSF16 with biocontrol potential against grapevine diseases, provide insights into its genes related to plant growth-promoting and biocontrol mechanisms. *Frontiers in Microbiology*. 2022; 13: 975344.
- 70.** Singh RR, Wesemael, WM. Endophytic *Paenibacillus polymyxa* LMG27872 inhibits *Meloidogyne incognita* parasitism, promoting tomato growth through a dose-dependent effect. *Frontiers in Plant Science*. 2022; 13: 961085.
- 71.** Chatterjee P, Samaddar S, Anandham R, et al. Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* OS261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth. *Frontiers in plant science*, 2017; 8: 705.
- 72.** Flores-Duarte NJ, Pérez-Pérez J, Navarro-Torre S, et al. Improved *Medicago sativa* nodulation under stress assisted by *Variovorax* sp. endophytes. *Plants*. 2022; 11(8): 1091.
- 73.** Searles PS, Flint SD, Caldwell MM. A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia*. 2001; 127 (1): 1-10.
- 74.** Kumar V, Suman U, Rubal YSK. "Flavonoid Secondary Metabolite: Biosynthesis and Role in Growth and Development in Plants," in *Recent Trends and Techniques in Plant Metabolic Engineering*, eds S. Yadav, V. Kumar, and S. Singh (Singapore: Springer). 2018 ; 19-45.

- 75.** Fu S, Deng Y, Zou K, et al. Flavonoids affect the endophytic bacterial community in Ginkgo biloba leaves with increasing altitude. *Frontiers in Plant Science*. 2022; 13: 982771.
- 76.** Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hocher V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signaling & Behavior*. 2012; 7: 636-641.
- 77.** Remus R, Ruppel S, Jacob HJ, et al. Colonization behaviour of two enterobacterial strains on cereals. *Biology and Fertility of Soils*. 2000; 30: 550-557.
- 78.** Patten C, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 1996; 42: 207-220.
- 79.** Adedeji AA, Babalola OO. Secondary metabolites as plant defensive strategy: a large role for small molecules in the near root region. *Planta*. 2020; 252: 61.
- 80.** Qi Y, Wang S, Shen C, et al. OsARF12, a Transcription activator on auxin response gene, regulates root elongation and affects iron accumulation in rice (*Oryza sativa*) *New Phytology*. 2012; 193: 109-120.
- 81.** Kasahara H. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016; 80: 34-42.
- 82.** Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007; 75: 1143-1150.
- 83.** Chen M, Blankenship RE. Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends in Plant Science*. 2011; 16: 427-431.
- 84.** Croce R, Van Amerongen H. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nature Chemical Biology*. 2014; 10: 492-501.
- 85.** Sati D, Pande V, Pandey SC, Samant M. Recent advances in PGPR and molecular mechanisms involved in drought stress resistance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2021; 1-19.
- 86.** Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*. 2014; 7(8): 1267-1287.
- 87.** Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, et al. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*. 2012; 28: 489-521.
- 88.** Fiorilli V, Catoni M, Lanfranco L, Zabet NR. Interactions of plants with bacteria and fungi: molecular and epigenetic plasticity of the host. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11: 274.
- 89.** Cartelat A, Cerovic Z, Goulas Y, et al. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*. 2005; 91: 35-49.
- 90.** Liu Y, Wang J, Xiao Y, et al. Diversity Analysis of Chlorophyll, Flavonoid, Anthocyanin, and Nitrogen Balance Index of Tea Based on Dualex. *Phyton*. 2021 ; 90: 1549-1558.
- 91.** Afzal I, Iqar I, Shinwari ZK, Yasmin A. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation*. 2017; 81: 399-408.
- 92.** Rodrigues AA, Forzani MV, Soares RdS, et al. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 2016; 46: 149-158.
- 93.** ALKahtani MD, Fouda A, Attia KA, et al. Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria from Desert Plants and Their Application as Bioinoculants for Sustainable Agriculture. *Agronomy*. 2020; 10: 1325.
- 94.** Chhabra S, Brazil D, Morrissey J, et al. Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *Microbiology*. 2013; 2: 717-724.

- 95.** Lacava PT, Azevedo JL. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System. In: Maheshwari D.K, Saraf M, Aeron A, editors. *Bacteria in Agrobiological System: Crop Productivity*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2013; 1–44.
- 96.** Chhabra S, Dowling DN. “Endophyte-promoted nutrient acquisition: phosphorus and iron” in *Functional importance of the plant microbiome: Implications for agriculture, forestry and bioenergy*. ed. S. L. Doty (Cham, Switzerland: Springer). 2017; 21-42.
- 97.** Dias ACF, Costa FEC, Andreote FD, et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009; 25: 189-195.
- 98.** Oves M, Khan MS, Qari HA. Chromium-reducing and phosphate-solubilizing *Achromobacter xylosoxidans* bacteria from the heavy metal-contaminated soil of the Brass city, Moradabad, India. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2019; 16: 6967-6984.
- 99.** Roslan MAM, Zulkifli NN, Sobri ZM, et al. Seed biopriming with P- and K-solubilizing *Enterobacter hormaechei* sp. improves the early vegetative growth and the P and K uptake of okra (*Abelmoschus esculentus*) seedling. *PloS one*. 2020; 15(7): e0232860.
- 100.** Saadouli I, Mosbah A, Ferjani R, et al. The impact of the inoculation of phosphate-solubilizing bacteria *Pantoea agglomerans* on phosphorus availability and bacterial community dynamics of a semi-arid soil. *Microorganisms*. 2021; 9(8): 1661.
- 101.** Soares AS, Nascimento VL, De Oliveira EE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* Isolated from Brazilian Cerrado Soil Act as Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Current Microbiology*. 2023; 80(5): 146.
- 102.** Zeng Q, Wu X, Wen X. Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2, and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings. *Annals of microbiology*. 2016; 66(4): 1343-1354.
- 103.** Hafeez B, Khanif YM, Saleem M. Role of zinc in plant nutrition—a review. *American Journal of Experimental Agriculture*. 2013; 3: 374-391.
- 104.** Gibson R. Zinc: The missing link in combating micronutrient malnutrition in developing countries. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2006; 65: 51-60.
- 105.** Upadhyay VK, Singh AV, Khan A. Cross talk between zinc-solubilizing bacteria and plants: A short tale of bacterial-assisted zinc biofortification. *Frontiers in Soil Science*. 2022; 1: 788170.
- 106.** Cakmak I, Kutman UB. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review: Agronomic zinc biofortification. *European Journal of Soil Science*. 2018; 69: 172–80.
- 107.** Fahsi N, Mahd I, Mesfioui A, et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria isolated from the Jujube (*Ziziphus lotus*) plant enhance wheat growth, Zn uptake, and heavy metal tolerance. *Agriculture*. 2021; 11(4): 316.
- 108.** Bhatt K, Maheshwari DK. Zinc solubilizing bacteria (*Bacillus megaterium*) with multifarious plant growth promoting activities alleviates growth in *Capsicum annum* L. *3 Biotech*. 2020; 10(2): 36.
- 109.** Mumtaz MZ, Ahmad M, Jamil M, Hussain T. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological research*. 2017; 202: 51-60.
- 110.** Kamran S, Shahid I, Baig DN, et al. Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Frontiers in microbiology*. 2017; 8: 2593.
- 111.** Ogale S, Yadav KS, Navale S. Screening of endophytic bacteria from the pharmacologically important medicinal plant *Gloriosa superba* for their multiple plant growth promoting properties. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2018; 7: 208-214.

- 112.** Ghosh SK, Banerjee S, Pal S. Encountering epidemic effects of leaf spot disease (*Alternaria brassicae*) on *Aloe vera* by fungal biocontrol agents in agri fields - An ecofriendly approach. *PLoS One*, 2018; 13: e0193720.
- 113.** Adeleke, BS, Ayangbenro AS, Babalola OO. In vitro screening of sunflower associated endophytic bacteria with plant growth-promoting traits. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2022; 6: 903114.
- 114.** Igiehon NO, Babalola OO, Aremu BR. Genomic insights into plant growth promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought stress. *BMC Microbiology*. 2019; 19: 159.
- 115.** Fahsi N, Mahdi I, Mesfioui A, Biskri L, Allaoui A. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria isolated from the Jujube (*Ziziphus lotus*) plant enhance wheat growth, Zn uptake, and heavy metal tolerance. *Agriculture*. 2021; 11(4): 316.
- 116.** Ganley RJ, Sniezko RA, Newcombe G. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management*. 2008; 255: 2751-2760.
- 117.** Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological control*. 2008; 46: 4-14.
- 118.** Fadiji AE, Babalola OO. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020; 8: 467.
- 119.** Raza W, Ling N, Liu D, et al. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology Research*. 2016; 192: 103-113.
- 120.** Raza W, Ling N, Yang L, et al. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Scientific Reports*. 2016; 6: 24856.
- 121.** Freitas CSA, Maciel LF, Corrêa dos Santos RA, et al. Bacterial volatile organic compounds induce adverse ultrastructural changes and DNA damage to the sugarcane pathogenic fungus *Thielaviopsis ethacetica*. *Environmental Microbiology*. 2022; 24: 1430-1453.
- 122.** Castro RA Quecine MC Lacava PT, et al. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*. 2014; 3: 382.
- 123.** Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012 ; doi.org/10.6064/2012/963401.
- 124.** Kumar A, Kumar A, Devi S, et al. Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: An in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*. 2012; 4: 1-5.
- 125.** Babalola OO. Pectinase and cellulase enhance the control of *Abutilon theophrasti* by *Colletotrichum coccodes*. *Biocontrol Science and Technology*. 2007; 17: 53-61.
- 126.** Chebotar V, Malfanova N, Shcherbakov A, et al. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015; 51: 271-277.
- 127.** Fadiji AE, Babalola OO. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020; 8: 467.
- 128.** Harba M, Jawhar M, Arabi MIE. In vitro antagonistic activity of diverse *Bacillus* species against *Fusarium culmorum* and *F. solani* pathogens. *The Open Agriculture Journal*. 2020; 14(1): 157-63.
- 129.** Haddoudi I, Sendi Y, Batnini M, et al. The bean rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain RZ9 strongly reduces *Fusarium culmorum* growth and infectiveness of plant roots. *Spanish journal of agricultural research*. 2017; 15(2): e1003-e1003.

- 130.** Kempf HJ, Wolf G. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. *Phytopathology*. 1989; 79(9): 990-994.
- 131.** Rebib H, Sadfi-Zouaoui N, Gargouri S, et al. Suppression of wheat seedling disease caused by *Fusarium culmorum* using bacterial seed treatment. *IOBC WPRS BULLETIN*. 2007; 30: 65.
- 132.** Mui-Yun W. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.): PP728 Soil-Borne Plant Pathogen Class Project. North Carolina State University; Raleigh, NC, USA: 2003.
- 133.** Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994; 7: 479-504.
- 134.** Ajmal M, Hussain A, Ali A, et al. Strategies for Controlling the Sporulation in *Fusarium* spp. *Journal of Fungi*. 2022; 9(1): 10.
- 135.** Sun G, Yao T, Feng C, et al. Identification, and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. *Biological control*. 2017; 104: 35-43.
- 136.** Castro RA, Quecine MC, Lacava PT, et al. Isolation and enzyme Bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *Springerplus*. 2014; 3: 382.
- 137.** Khan N, Martínez-Hidalgo P, Ice TA., et al. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 2363.
- 138.** Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*. 2008; 16: 115-125.
- 139.** Wang J, Liu J, Chen H, Yao J. Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007; 76: 889-894.
- 140.** Tendulkar S, Saikumari Y, Patel V, et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 103: 2331-2339.
- 141.** Zhang QL, Zhu QH, Liang MZ, et al. Comparative transcriptomic analysis provides insights into antibacterial mechanisms of *Branchiostoma belcheri* under *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunology*. 2018; 76: 196-205.
- 142.** Singh N, Kumar S, Bajpai VK, et al. Biological control of *Macrophomina phaseolina* by chemotactic fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* PN1 and its plant growth promotory activity in chirpine. *Crop Protection*. 2010; 29: 1142-1147.
- 143.** Liang H, Duan J, Sibley CD, Surette MG, Duan K. Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 2011; 60: 22-34.
- 144.** Yin D, Wang N, Xia F, Li Q, Wang W. Impact of biocontrol agents *Pseudomonas fluorescens* 2P24 and CPF10 on the bacterial community in the cucumber rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*. ;2013; 59: 36-42.
- 145.** Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 2005; 56: 845-857.
- 146.** Xu S, Liu YX, Cernava T, et al. *Fusarium* fruiting body microbiome member *Pantoea agglomerans* inhibits fungal pathogenesis by targeting lipid rafts. *Nature Microbiology*. 2022; 7: 831-43.
- 147.** Kavitha S, Senthilkumar S, Gnanamanickam S, et al. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process Biochemistry*. 2005; 40: 3236-3243.
- 148.** Cho KM, Hong SY, Lee SM, et al. A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006; 73: 618-630.

- 149.** Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews*. 2016; 36: 4-31.
- 150.** Sieber SA, Marahiel MA. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* 2005; 105: 715-738.
- 151.** Li Y, Chen S. Fusaricidin produced by *Paenibacillus polymyxa* WLY78 induces systemic resistance against *Fusarium* wilt of cucumber. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(20): 5240.
- 152.** Jiang L, Jeong JC, Lee JS, et al. Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 16354.
- 153.** Vanneste J, Yu J, Reglinski T, Allan A. Biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain NZ501 induces a resistance-like response in kiwifruit and tobacco cells. IX International Workshop on Fire Blight. 2001; 590: 279-283.
- 154.** Walterson AM, Smith DD, Stavrinides J. Identification of a *Pantoea* biosynthetic cluster that directs the synthesis of an antimicrobial natural product. *PloS one*. 2014; 9: e96208.
- 155.** Kousser C, Clark C, Sherrington S., et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *Rhizopus microsporus* germination through sequestration of free environmental iron. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 5714.
- 156.** Goswami M, Deka S. Plant growth-promoting rhizobacteria alleviators of abiotic stresses in soil: A review. *Pedosphere*. 2020; 30: 40-61.
- 157.** Liu F, Xing S, Ma H, et al. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013; 97: 9155-9164.
- 158.** Jorge GL, Kisiala A, Morrison E, et al. Endosymbiotic *Methylobacterium oryzae* mitigates the impact of limited water availability in lentil (*Lens culinaris* Medik.) by increasing plant cytokinin levels. *Environmental and Experimental Botany*. 2019; 162: 525-540.
- 159.** Song J, Jiang L, Jameson PE. Co-ordinate regulation of cytokinin gene family members during flag leaf and reproductive development in wheat. *BMC Plant Biology*. 2012; 12: 78.
- 160.** Shigenaga AM, Berens ML, Tsuda K, Argueso CT. Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 2017; 38: 164-172.
- 161.** Akhtar SS, Mekureyaw MF, Pandey C, Roitsch T. Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 10: 1777.
- 162.** Choi J, Huh SU, Kojima M, et al. The Cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. 2010; 19: 284-295.
- 163.** Argueso CT, Ferreira FJ, Epple P, et al. Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genetic*. 2012; 8: e1002448.
- 164.** Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*. 2006; 140: 249-262.
- 165.** Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera B. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonate and salicylate pathways. *The European Journal of Plant Pathology*. 2011; 131: 15-26.
- 166.** Rodrigues FCT, Aucique-Perez CE, Fontes BA, et al. Involvement of ethylene in wheat resistance to infection by *Pyricularia oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2020; 112: 101526.

- 167.** Vleeschauwer D, Yang Y, Cruz CV, Hofte M. Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Physiologia Plantarum*. 2010; 152: 2036-2052.
- 168.** Wi SJ, Ji NR, Park KY. Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in tobacco plants. *Physiologia Plantarum*. 2012; 159: 251-265.
- 169.** Brutus A, Sicilia F, Macone A, et al. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2010; 107: 9452-9457.
- 170.** Tocquard K, Lafon-Placette C, Auguin D, et al. In silico study of wall-associated kinase family reveals large-scale genomic expansion potentially connected with functional diversification in *Populus*. *Tree Genetics & Genomes*. 2014; 10: 1135-1147.
- 171.** Gadaleta A, Colasuonno P, Giove SL, et al. Map-based cloning of QFhb.mgb-2A identifies a WAK2 gene responsible for *Fusarium* Head Blight resistance in wheat. *Scientific Reports*. 2019; 9: 6929.
- 172.** Chen T, Xiao J, Xu J, et al. Two members of TaRLK family confer powdery mildew resistance in common wheat. *BMC Plant Biology*. 2016; 16: 27.
- 173.** Almagro L, Gomez Ros LV, Belchi-Navarro S, et al. Class III peroxidases in plant defense reactions. *Journal of Experimental Botany*. 2009; 60: 377-390.
- 174.** Rana A, Saharan B, Ranjan Kabi S, et al. Povidencia, a PGPR with biocontrol potential elicits defense enzymes in wheat. *Annals of Plant Protection Sciences*. 2011; 19: 138-141.
- 175.** Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, et al. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the incompatible and compatible interaction of wheat-*Puccinia striiformis* f.sp. tritici. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2007; 71: 230-239.
- 176.** Ahanger MA, Agarwal RM. Potassium improves antioxidant metabolism and alleviates growth inhibition under water and osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L). *Protoplasma*. 2017; 254: 1471-1486.
- 177.** Jamali H, Sharma A, Roohi Z, Srivastava AK. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*. 2020; 60: 268-280.
- 178.** Sahu K, Singh S, Gupta AR, et al. Endophytic bacilli from medicinal-aromatic perennial Holy basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) modulate plant growth promotion and induced systemic resistance against *Rhizoctonia solani* in rice (*Oryza sativa* L.). *Biological control*. 2020; 150: e104353.
- 179.** Abbas A, Fu YP, Qu Z, et al. Isolation and evaluation of the biocontrol potential of *Talaromyces* spp. against rice sheath blight guided by soil microbiome. *Environmental Microbiology*. 2021; 23: 5946-5961.
- 180.** Duan YH, Guo J, Ding K, et al. Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*. 2011; 38: 301-307.
- 181.** Zhang H, Zhang F, Yu Y, et al. A comprehensive online database for exploring ~20,000 public *Arabidopsis* RNA-Seq libraries. *Molecular Plant*. 2020; 13: 1231-1233.
- 182.** Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, et al. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the incompatible and compatible interaction of wheat-*Puccinia striiformis* f.sp. tritici. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2007; 71: 230-239.
- 183.** Ray D, Ghosh A, Mustafi SB, Raha S. Plant stress response: Hsp70 in the spotlight. In *Heat Shock Proteins and Plants*. Springer, Cham. 2016. pp. 123-147.
- 184.** Driedonks N, Xu J, Peters JL, et al. Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6: 999.

- 185.** Podgórska A, Burian M, Szal B. Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: Apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8: 1353.
- 186.** Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014; 1840: 1596-1604.
- 187.** Li G, Chen T, Zhang Z, et al. Roles of aquaporins in plant-pathogen interaction. *Plants*. 2020; 9: 1134.
- 188.** Berka M, Kopecká R, Berková V, et al. Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity. *Journal of Experimental Botany*. 2022; 73: 1894-1909.
- 189.** Vanholme R, De Meester B, Ralph J, Boerjan, W. Lignin Biosynthesis and Its Integration into Metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019; 56: 230-239.
- 190.** Wang L, Chen M, Lam PY, et al. Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome*. 2022; 10: 233.
- 191.** Shine MB, Yang JW, El-Habbak M, et al. Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. *New Phytology*. 2016; 212: 627-636.
- 192.** Basha SA, Chatterjee SC. Effect of PGPR on *Sclerotinia sclerotiorum* infection through elicitation of phenylalanine ammonia lyase in chickpea. *Indian Phytopathology*. 2012; 60: 313-316.
- 193.** Garcia-Seco D, Zhang Y, Gutierrez-Manero FJ, et al. Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism. *PLoS One*. 2015; 10: e0142639.
- 194.** Tiwari S, Singh P, Tiwari R, et al. Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 2011; 47: 907.
- 195.** Ali S, Ganai BA, Kamili AN, et al. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiology Research*. 2018; 212-213: 29-37.
- 196.** Yamazaki A, Hayashi M. Building the interaction interfaces: host responses upon infection with microorganisms. *Current Opinion in Plant Biology*. 2015; 23: 132-139.
- 197.** Lu ZX, Wang F, Liang F, et al. Inducers of resistance reduce common bunt infection in wheat seedlings while differentially regulating defence-gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2005; 67: 138-148.
- 198.** Zhang J, Wang F, Liang F, et al. Functional analysis of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaLr35PR5 from wheat induced by leaf rust fungus. *BMC Plant Biology*. 2018; 18: 1-11.
- 199.** Zhu X, Wang Y, Su Z, et al. Silencing of the wheat protein phosphatase 2A catalytic subunit TaPP2AC enhances host resistance to the necrotrophic pathogen *rhizoctonia cerealis*. *Frontiers in Plant Science*. 2018; 871: 1-13.
- 200.** Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors, V. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *The Annual Review of Plant Biology*. 2017; 68: 485-512.
- 201.** Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 2004; 94: 1259-1266.
- 202.** Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *The Annual Review of Phytopathology*. 2014; 52: 347-375.
- 203.** Jayamohan NS, Patil SV, Kumudini BS. Seed priming with *Pseudomonas putida* isolated from rhizosphere triggers innate resistance against *Fusarium* wilt in tomato through pathogenesis-related protein activation and phenylpropanoid pathway. *Pedosphere*, 2020; 30: 651-660.



- 204.** Walters DR, Ratsep J, Havis ND. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*. 2013; 64: 1263-80.
- 205.** Tiwari M, Prashant S. Plant Defense Priming: A New Tool for Sustainable Global Food Security. In: Gyan Singh Shekhawat, editors. *Agricultural Innovations and Sustainability*. 2021; pp. 133-153.0



# **Discussion générale**

L'agriculture moderne est le fruit de la domestication des plantes sauvages par l'homme. Ce processus a perduré sur des milliers d'années. Depuis lors, la demande des produits agricoles est toujours croissante à cause de l'augmentation rapide de la population mondiale et de ses modes de consommation (Pawlak et Kołodziejczak, 2020 ; Fasusi et al., 2021). Depuis l'avènement de la chimie agricole (*ie* milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle), avec une accélération de ses développement et utilisation au cours de ces dernières décennies, les systèmes agricoles ont été adaptés à cette demande exponentielle par l'utilisation notamment de produits chimiques (*ie* engrais et pesticides). L'enjeu global fut d'augmenter la production agricole et d'en améliorer le rendement, la qualité et la durée de conservation des produits finaux, et cela dans un laps de temps limité. Toutefois, ces pratiques sont à l'origine de la dégradation des écosystèmes, des changements climatiques, de l'érosion systémique des sols et de pertes de la biodiversité (Fasusi et al., 2021 ; Mitter et al., 2021). De plus, les maladies causées par des agents phytopathogènes en général, et des cryptogames en particulier qui sont présents dans le sol et l'air, représentent une menace supplémentaire grave qui impacte significativement la production de plusieurs cultures dans le monde (Brauer et al., 2019 ; Cullen et al., 2019 ; Omomowo et Babalola, 2019). En dépit de ce constat alarmant, la production agricole devra augmenter d'ici 2050 d'environ 70% par rapport à son niveau actuel, et ce afin de répondre à la demande d'une population croissante. Cependant, les études actuelles estiment que la production alimentaire mondiale diminuera de 12% au cours des 25 prochaines années en raison de la dégradation notable et généralisée des terres agricoles (ELD Initiative, 2015 ; Singh et al., 2020).

Le blé est une variable particulièrement critique dans l'approvisionnement alimentaire mondiale. Il représente un cinquième du total des calories et des protéines consommées chaque année par 7.9 milliards d'habitants (FAO, 2020). Les rendements des cultures sont très variables en raison des conditions météorologiques fluctuantes et des ravageurs. Ces derniers entraînent des dommages majeurs, dont les pertes annuelles représentent 10 à 50% des récoltes de blé dans le monde (Oerke, 2006 ; Savary et al., 2019). En outre, les changements climatiques amplifient ces problèmes, en augmentant le stress des plantes (et diminuant *de facto* leurs performances physiologiques de croissance et de résistance), et en élargissant l'aire de répartition naturelle des agents phytopathogènes (Bebber et al., 2013).

En Tunisie, les céréales et leurs dérivés sont les principales sources de calories alimentaires. Elles constituent la base commune de tous les régimes alimentaires. La culture du blé représente environ 60% des cultures céréalières. Toutefois, cette culture est limitée par des pluies insuffisantes et irrégulières, qui la prédisposent à contracter différentes maladies fongiques, provoquant des dégâts significatifs (Khemir et al., 2020).

*Fusarium culmorum* est un pathogène dominant en Tunisie et dans la région méditerranéenne. Il est responsable de plusieurs maladies dont la brûlure des semis, causant d'importants dégâts aux plantes en croissance et pouvant entraîner des pertes de rendement élevées (Gargouri et al., 2001). Ce champignon est très difficile à contrôler, notamment lié à son aptitude remarquable à survivre sous formes d'hyphes dans les résidus de chaume de céréales (Cook, 1968 ; Bateman et Murray, 2001 ; Burgess, 2011 ; Khemir et al., 2018) et de chlamydospores dans le sol (Sitton et Cook, 1981). Les moyens

de lutte contre *F. culmorum* reposent sur l'application massive de fongicides. Cependant, ils sont non seulement toxiques pour l'ensemble de la biodiversité naturelle, mais une exposition prolongée entraîne l'apparition de phénotypes résistants (Becher et al., 2010 ; Serfling et Ordon, 2014). Par ailleurs, certaines stratégies de gestion agronomique comme les rotations de culture sont de moins en moins possibles car le blé est à ce jour une culture dominante en Tunisie. Enfin, dans le contexte du changement climatique en cours, ce champignon pourrait devenir plus compliqué à contrôler surtout que la région méditerranéenne a été qualifiée de « point chaud du changement climatique » (Giorgi, 2006 ; Vicente-Serrano, 2006).

Au début des années 1970, après la révolution verte, les variétés locales de blé ont été progressivement abandonnées et remplacées par des cultivars modernes améliorés (Bonjean et Angus, 2001 ; Ortiz et al., 2007). Aujourd'hui, ces variétés locales sont principalement cultivées par de petits exploitants agricoles dans le cadre d'agrosystèmes traditionnels à faibles intrants, et correspondent à des zones agricoles tunisiennes marginales (Slim et al., 2019). Néanmoins, ces variétés locales représenteraient un réservoir riche d'endophytes potentiellement bénéfiques par rapport aux variétés modernes. En effet, la domestication, dont l'objectif fut de tendre à améliorer fortement et rapidement les performances des cultures, aurait perturbé profondément les processus sélectifs dans l'assemblage des microbiomes du blé (Valente et al., 2020).

Dans cette thèse, trois éléments clés ont été identifiés : i) le blé comme principale culture et source alimentaire en Tunisie, ii) *F. culmorum* comme agent pathogène dominant qui menace cette culture, et iii) la valorisation d'alternatives ambitieuses aux engrais chimiques et aux pesticides qui assureront le contrôle de ce pathogène afin de garantir un rendement de culture stable tout en étant respectueuses de l'environnement.

L'exploration et l'identification du microbiome des plantes indigènes dans le rétablissement des associations bénéfiques perdues lors de la domestication représentent une alternative prometteuse. Ces actions s'appuient sur une approche appelée « back to the roots » et proposée par Pérez-Jaramillo et ses collègues. Le microbiome d'une variété ancienne de blé « *Florence Aurore* » cultivée dans conditions d'agriculture biologique a été choisi pour cette étude. Il est bien connu que chaque espèce végétale possède son propre microbiome qui agit de manière commensale et/ou bénéfique pour son hôte (Johnston et Raizada, 2011 ; Kushwaha et al., 2020 ; Zhang et al., 2019). A l'instar du microbiome humain dans le maintien d'une bonne santé, le microbiome végétal joue un rôle critique dans la stimulation des performances physiologiques de l'hôte, et l'atténuation des effets néfastes de divers types de stress (Hirt, 2020 ; Wagner, 2022).

La compréhension de la diversité microbienne et de leur fonction dans des environnements complexes a considérablement augmenté grâce à l'application des méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS) (Battu et al., 2017 ; Oita et al., 2021). Bien que très puissantes dans la génération d'information sur ces communautés, ces approches de séquençage sont néanmoins corrélatives. Elles doivent être couplées avec des méthodes de mise en culture microbiologique pour isoler et caractériser des micro-organismes prometteurs. Toutefois, ces techniques basées sur la culture des micro-organismes présentent également des limites. Cependant, elles constituent actuellement

le moyen le plus fiable pour valider nos hypothèses écologiques et confirmer *in planta* le caractère bénéfique des souches isolées (Kavamura et al., 2019 ; Gutleben et al., 2018). En effet, il est souhaitable d'obtenir une séquence génomique d'un microbe d'intérêt, et c'est mieux obtenu à partir d'une culture pure d'un micro-organisme donné, par opposition à l'assemblage informatique à partir des métagénomes, où il peut être difficile d'associer avec précision les éléments génétiques centraux et accessoires à un génome particulier (Kavamura et al., 2021).

L'utilisation du microbiome comme une source d'inoculants microbiens est un levier bien identifié pour augmenter la productivité, réduire le coût des cultures et maintenir la santé du sol et de l'environnement. Malgré ces connaissances, son utilisation dans les cultures de blé est encore paradoxalement très limitée (Mahapatra et al., 2020). L'approche culture dépendante utilisée dans cette étude a permis de récupérer des candidats fongiques et bactériens de l'endosphère et de la rhizosphère de la variété *Florence Aurore*. Après identification moléculaire par séquençage de l'ADNr 16S et de la région ITS des isolats bactériens et fongiques respectivement, plusieurs d'entre eux ont été rapportés comme biostimulateurs et bioprotecteurs dans la bibliographie. Cela concerne le genre fongique *Trichoderma*. Il a été spécifiquement ciblé par un isolement sélectif de part son caractère prédominant dans plusieurs écosystèmes du sol, sa capacité à coloniser les racines des plantes et son potentiel reconnu dans le biocontrôle d'une large gamme de phytopathogènes (Tyśkiewicz et al., 2020). Par ailleurs, la partie aérienne des plantes a été étudiée en ciblant spécifiquement l'épi. Cet organe est un réservoir reconnu de micro-organismes bénéfiques vivant à la surface des épillets et faisant partie d'une communauté transmise verticalement par les graines (Kavamura et al., 2021). Au niveau de la partie souterraine, les racines et la rhizosphère ont été ciblées car elles représentent une niche écologique de micro-organismes à la diversité remarquable et qui contribue grandement à la santé et à la productivité des plantes. En effet, ces communautés microbiennes promeuvent la croissance de la plante en stimulant l'absorption de nombreux nutriments, et leur tolérance aux facteurs de stress biotiques et abiotiques, et cela grâce notamment à leur propre activité métabolique et leur aptitude à produire des phytohormones (Bulgarelli et al., 2013 ; Philippot et al., 2013 ; Bejarano-Bolívar et al., 2021).

Cette première étape d'isolement et d'identification a été suivie par une caractérisation des capacités fonctionnelles *in vitro* et *in planta*. L'adoption de cette stratégie a permis la sélection de nouveaux inoculants. Etant donné la complexité des expérimentations à entreprendre pour tester et valoriser l'ensemble du microbiome isolé (en terme de temps et de moyens), nous avons ciblé les endophytes bactériens évoluant au niveau des racines ainsi que six souches différentes de *Trichoderma*. Le choix des isolats s'est basé sur une analyse préliminaire des séquences ARNr 16S et ITS, respectivement.

Les tests *in planta* des souches sélectionnées ont été réalisés sur les variétés « Karim » et « Khiar ». Ces variétés sont parmi les plus commercialisées en Tunisie. Les graines ont été inoculées avec les micro-organismes sélectionnés *via* une approche d'enrobage. Cette technique est considérée être une méthode précise et peu onéreuse pour installer sur graines des inoculants microbiens en petites quantités avec un potentiel d'application à grande échelle, par rapport à une inoculation des micro-organismes directe sur plantes

qui exigerait une plus grande quantité d'inoculum microbien (Ehsanfar et Modarres-Sanavy, 2005 ; O'Callaghan, 2016).

L'évaluation des effets induits par les micro-organismes ainsi enrobés a été entreprise sur les plants de blé à plusieurs échelles : i) macroscopique, ii) physiologique et iii) moléculaire. Ces analyses multidisciplinaires ont permis d'avoir un profil détaillé des aptitudes biostimulatrices des souches testées.

En premier lieu, et fait de première importance, aucun symptôme macroscopique morbide particulier ne fut observé chez les plantules de blé en contact avec les isolats fongiques et bactériens. Cette situation résulterait de la non-expression d'une quelconque pathogénicité des souches testées en réponse à l'enrobage des graines, pouvant ainsi confirmer qu'elles seraient bien adaptées à leur hôte. En effet, les endophytes bactériens testés et qui ont colonisé les racines saines de leur hôte d'origine auraient pu toutefois présenter différents comportements trophiques et ainsi induire de la part de l'hôte des réponses physiologiques contrastées. Selon la définition des endophytes, ces micro-organismes peuvent être bénéfiques, neutres ou des agents pathogènes latents. A cet égard, il y avait un risque que certains isolats aient la possibilité d'exprimer une certaine pathogénicité sur les variétés modernes étudiées (Comby et al., 2016). Cette attention concernait aussi le genre *Trichoderma* car, si les membres de ce genre fongique sont généralement considérés comme bénéfiques pour la plante, une étude récente a signalé certaines espèces de *Trichoderma afroharzianum* comme étant pathogène sur le blé et l'orge, provoquant des symptômes de maladie particuliers et réduisant considérablement les rendements (Pfordt et al., 2023).

L'effet bénéfique du microbiome bactérien du blé dans la stimulation des performances de croissance végétale a été rapporté dans plusieurs études (Chen et al., 2022 ; Kavamura et al., 2021 ; Mahapatra et al., 2020 ; Majeed et al., 2015). Il en est de même pour plusieurs espèces de *Trichoderma*, l'un des groupes fongiques prédominant dans la rhizosphère et le plus étudié dans la protection biologique des cultures (Harman et al., 2004 ; Qi et Zhao, 2013). Ainsi, dans notre étude, l'évaluation macroscopique et physiologique des isolats testés a montré différents effets stimulateurs significatifs sur la croissance des plantes de blé avec notamment une augmentation des biomasses fraîche et sèche, des longueurs des racines et de la partie aérienne, et de la teneur en chlorophylle totale. L'amplitude de ces augmentations diffère d'une souche à une autre, toutefois, les effets bénéfiques observés confirment la possibilité de valorisation de certaines d'entre elles comme alternatif aux fertilisants chimiques, et potentiellement adaptable à un contexte agricole Tunisien en lien direct avec l'origine d'isolement de celles-ci.

A l'échelle moléculaire, la quantification par qPCR de l'expression de plusieurs gènes de défenses aux niveaux foliaire et racinaire après 3 semaines de contact graine de blé/micro-organisme a révélé que les défenses végétales sont modulées de manière durable et systémique par toutes les souches. L'amélioration de la résistance systémique induite (ISR) contrant le cycle infectieux de plusieurs agents phytopathogènes est à l'origine de l'intérêt croissant développé par les chercheurs et agriculteurs pour le genre *Trichoderma* et plusieurs clades de bactéries endophytes (Compant et al., 2005 ; Ilham et al., 2019). A travers le traitement des semences, ces agents ont la capacité de contrôler plusieurs maladies cryptogamiques en activant les défenses de leur hôte. Ce potentiel

d'activation de l'ISR est attribué à la sécrétion de métabolites signal particuliers, qui agissent de concert avec ceux qui intègrent les événements d'antibiose et de mycoparasitisme (Van Loon et al., 2006 ; Shores et al., 2010 ; Le Mire et al., 2018 ; Ongena et al., 2007).

L'activité antagoniste des souches a été évaluée contre *Fusarium culmorum*. Ce pathogène est dominant en Tunisie et difficile à gérer. Cette situation devrait s'amplifier dans les prochaines années avec les changements climatiques enregistrés (Khemir et al., 2020).

Le test de confrontation direct (ou en double culture) que nous avons employé est parmi les méthodes les plus courantes pour l'identification de puissants inhibiteurs fongiques. Il offre la possibilité d'un contact physique direct de la souche testée avec l'agent pathogène. Il permet également d'évaluer la sécrétion de composés volatils dans le compartiment aérien de la boîte de culture ou diffusibles dans le milieu gélosé (Kjeldgaard et al., 2022). Ce test a servi de point de départ pour sélectionner les souches bactériennes et fongiques antagonistes. Au total, cinq souches bactériennes présentaient des taux d'inhibition qui dépassent les 40%. Elles furent alors sélectionnées pour étudier plus exhaustivement leurs mécanismes d'action. Quant aux six souches de *Trichoderma* sélectionnées, toutes étaient efficaces avec des taux d'inhibition supérieurs à 50%.

L'activité antagoniste des souches de *Trichoderma* a été orientée vers la lutte contre la fusariose de semences. Cette maladie cause d'importants dégâts aux semis en germination et aux plantules en croissance, conduisant à une réduction notable du nombre d'épis viables par mètre carré et du rendement en grains (Humphreys et al., 1998 ; Wong et al., 1992 ; Wiese, 1977). Cette maladie a reçu moins d'attention par rapport à la fusariose de l'épi qui risque de contaminer les grains par des mycotoxines (Khan et al., 2006). Les analyses *in planta* ont été réalisées suivant la technique d'enrobage des graines avec des spores de *Trichoderma* suivie d'une pulvérisation avec des spores de *Fusarium culmorum*. Cette application « préventive » des isolats s'est montrée très efficace pour toutes les souches testées. Bien qu'elles développaient des niveaux de protection différents, leur présence sur plants viables s'illustre par l'absence totale de symptômes de la fusariose des semences, tant au niveau des plantules issues des graines en germination que sur les jeunes plants en croissance. Ce test fut intégralement mené soit en milieu axénique (germination des graines, avec un suivi sur une semaine), soit en chambre de culture pour les jeunes plants durant trois semaines. Nos résultats ne préjugent en rien du comportement bioprotectant des isolats en plein champ, néanmoins, ces données restent très prometteuses. Par ailleurs, la résistance des plants s'est doublée d'une amélioration du taux de germination des graines et d'une augmentation de leur biomasse lors de leur développement, en comparaison avec les graines infectées uniquement par *F. culmorum* dont la plupart ont rapidement péri. Ainsi, les souches *Tahz02*, *Tahz03*, *Tatr01* et *Tlix01*, même en présence de *F. culmorum*, ont exercé un double effet biostimulateur et bioprotecteur sur blé, confirmant leur potentiel bénéfique comme un outil de gestion durable et une alternative aux engrais et pesticides. Ce résultat est supporté par les travaux de Vitti et ses collègues (2022) qui ont montré l'efficacité de l'enrobage des graines de blé par *Trichoderma harzianum* dans la protection contre la fusariose du collet.

L'efficacité élevée d'inhibition du développement mycélien de *F. culmorum* développé par les 5 isolats bactériens nous a permis d'envisager des expérimentations plus poussées

afin d'identifier certains des mécanismes responsables. Plusieurs pistes d'investigation s'offraient à nous, mais nous nous interrogeons sur une en particulier : l'évaluation de leur potentiels antibiose vis-à-vis de la sporulation et la germination des macroconidies de *F. culmorum*. Les spores de ce champignon agissent comme des propagules infectieuses qui déclenchent l'infection. Par ailleurs, sa capacité de se développer sur une large diversité de substrats et l'efficacité remarquable de dispersion des spores expliquent sa dissémination étendue (McMullen et al., 2012 ; Mui, 2003 ; Nelson et al., 1994). Par conséquent, le développement de stratégies d'inhibition de la sporulation et de la germination des spores serait pertinent pour contrôler la propagation et l'infection de cet agent pathogène. Nos essais menés *in vitro* ont montré l'efficacité de 3 souches en particulier : *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus peoriae* et *Pantoea agglomerans*. Ces souches inhibent totalement ou presque la sporulation, ainsi que la germination des macroconidies, que ce soit par contact direct ou à travers leurs fractions intracellulaires purifiées. L'utilisation de ces souches d'intérêt ou de leurs métabolites intracellulaires en agriculture sera une option intéressante. A cet égard, cela concernera dorénavant la souche de *Paenibacillus peoriae* qui, pour la première fois ici, démontre son potentiel élevé pour le contrôle biologique de *F. culmorum*. Finalement, ces souches constitueraient une solution pertinente pour contrôler la propagation et la germination des spores de *F. culmorum* tout en préservant les écosystèmes.

Ces bactéries endophytes gagnent de plus en plus en intérêt biotechnologique et industriel en raison de leurs activités multiples, à la fois directes comme agents de biocontrôle contre de nombreux bioagresseurs (parasitisme), et indirectes *via* la sécrétion de métabolites secondaires aux actions antimicrobiennes, antivirales, insecticides, anti-tumorales et immunosuppressives. De même, ces métabolites sont connus pour être des antioxydants naturels, et des substances antidiabétiques et antibiotiques efficaces (Gouda et al., 2016 ; Yadav, 2018).

L'évaluation *in vitro* des aptitudes PGP et BCA nous a permis d'avoir une vue globale et détaillée du potentiel des isolats que nous avons sélectionnés, et cela à plusieurs niveaux : entre micro-organismes (bactéries *vs* champignons), entre différents genres bactériens et entre espèces du même genre pour *Trichoderma* principalement, et pour quelques espèces bactériennes. En plus, cette évaluation a révélé une partie des mécanismes directs et indirects utilisés par ces souches pour exercer leur potentiel biostimulateur et bioprotecteur. Toutes nos souches testées dans cette thèse ont montré des caractères « PGP », avec la solubilisation du phosphate et du zinc, la production de l'ammoniac et du cyanure d'hydrogène. Ces capacités sont impliquées directement dans la stimulation de la croissance des plantes, et rapportées dans plusieurs publications scientifiques (Rigobelo et al., 2023). De même, l'activité antagoniste a concerné la production de composés organiques volatils et de substances diffusibles en milieu de culture pour *Trichoderma*, et des substances actives présentes dans les filtrats des cultures pour les bactéries endophytiques. Ces mécanismes ont fait l'objet de plusieurs recherches dont celles de Intana et al. (2021) qui ont prouvé la capacité de *Trichoderma asperellum* à libérer des composés organiques volatils responsable de l'inhibition de *Fusarium incarnatum*, ainsi que les résultats de Al-Mutar et al. (2023) qui ont montré une activité antifongique du surnageant de culture de *Bacillus amyloliquefaciens* contre *Fusarium oxysporum*. La production d'enzymes extracellulaires comme la Catalase, l'Amylase, la Cellulase, la



Pectinase, la Protéase et la Chitinase participerait à inhiber indirectement le développement des agents phytopathogènes, même si ces enzymes seules ne sont pas totalement efficaces en tant que substances antagonistes, elles peuvent néanmoins renforcer les activités antagonistes des micro-organismes bénéfiques lorsqu'elles sont combinées à d'autres mécanismes moléculaires (antibiotiques, « antigerminatifs », etc.) (Fadiji et Babalola, 2020).

Les micro-organismes valorisés dans cette thèse représentent une source riche de métabolites secondaires naturels, ainsi qu'une source de biofertilisants et de promoteurs de croissance. A cet égard, ils peuvent être considérés comme des candidats naturels et durables pour minimiser l'utilisation de produits agrochimiques. L'implication de ces outils microbiologiques dans le développement de l'agriculture et des processus biotechnologiques semble alors évidente et urgente puisqu'ils solutionneraient de nombreux problèmes concernant l'agriculture durable par rapport aux pratiques entièrement dépendantes des pesticides et des engrais synthétiques et leurs impacts négatifs notoires sur l'environnement et la santé humaine.



# **Conclusion et Perspectives**

## Conclusion

Cette thèse a pour objectif d'approfondir notre compréhension sur la structure et les fonctions des communautés bactériennes et fongiques associées à une variété ancienne de blé, *Florence Aurore*, tout en explorant leurs mécanismes déployés par ces micro-organismes et impliqués dans la stimulation de la croissance et la résistance à *F. culmorum*. De plus, nous avons pu caractériser les potentiels bénéfiques PGP et stimulation de l'immunité innée végétale chez de nouvelles espèces bactérienne endophytes.

Ces microbiomes se révèlent dotés de rôles bénéfiques multiples, ouvrant la voie à des multiples avantages substantiels par rapport aux approches traditionnelles d'amélioration des cultures. En particulier, leur exploitation offre une alternative prometteuse à l'usage massif d'engrais et de pesticides, contribuant ainsi à améliorer le rendement et la protection des cultures. L'isolement de souches particulières d'un microbiome de blé au moyen des deux procédures distinctes et réalisées au cours de cette étude a fourni un éclairage précieux sur la composition des communautés bactériennes et fongiques associées au blé. De plus, cet isolement a révélé des candidats prometteurs, notamment des souches de *Trichoderma* et des bactéries endophytes racinaires, qui ont été étudiés afin de vérifier leur aptitude à améliorer la croissance du blé et le contrôle de *Fusarium culmorum*. Les résultats de cette recherche ont démontré que les souches de *Trichoderma* ont le potentiel de stimuler la croissance des plantes et de servir d'agents de lutte biologique efficaces contre la fusariose des semences causée par *F. culmorum*, avec une capacité à induire des réponses immunitaires systémiques et durables chez le blé. Parallèlement, les bactéries endophytes ont présenté des propriétés favorables à l'augmentation des performances immunitaires et végétales du blé ainsi qu'un potentiel inhibiteur *in vitro* contre le développement du mycélium, la formation et la germination des spores de *F. culmorum*, suggérant ainsi leur utilisation potentielle comme alternative aux traitements chimiques contre la propagation des spores de cet agent pathogène. Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives passionnantes pour une agriculture durable et une sécurité alimentaire en Tunisie dans le domaine céréalier.

## Perspectives

Pour accroître la diversité des souches isolées dans cette étude, il est judicieux de varier les milieux de culture et leur composition, ainsi que d'autres facteurs comme le pH, la température d'incubation et l'aération. L'utilisation d'autres milieux sélectifs peut être utile pour l'isolement de micro-organismes avec des capacités physiologiques particulières comme les fixateurs d'azote. De même, le développement de nouvelles stratégies de culture ou en affinant celles qui existent peut améliorer l'isolement et la culture de la communauté microbienne « incultivable ». Celle-ci représente 99% et 90% des microbes existant dans le sol, et dans les racines respectivement. Leur étude peut permettre l'identification de nouvelles espèces dotées de fonctions importantes au bénéfice de la plante hôte.

Les *Plant Growth Promoting Microbes* identifiés dans cette étude offrent la possibilité de combiner plusieurs souches fongiques et bactériennes de genre *Trichoderma*,

*Pseudomonas*, *Bacillus* et *Paenibacillus* pour développer une communauté synthétique (SynComs). La création artificielle d'une SynCom par co-culture sur un milieu spécifique peut amplifier l'effet stimulateur sur les performances végétales et tamponner les variabilités éventuelles des aptitudes PGP et BCA par rapport à une simple inoculation avec une seule espèce microbienne. Il sera toutefois nécessaire de vérifier au préalable la compatibilité viable des souches entre elles.

Plusieurs souches isolées dans notre étude n'ont pas été testées et reportées comme bénéfiques dans la littérature. Elles doivent être étudiées, au côté d'autres souches qui montrent des résultats préliminaires encourageants comme *Periconia macrospinoso* dont son effet sur la physiologie du blé et son rôle dans l'écosystème ne sont pas encore bien connus.

Des études ont montré l'efficacité de la double inoculation avec des *Trichoderma* et des endophytes bruns septés dans la stimulation de la performance des plantes ainsi que dans l'adaptation à la sécheresse. Cette approche peut être réalisée avec plusieurs taxons microbiens et dans des conditions environnementales et de cultures très bien définies, cela afin d'imiter la structure et la fonction du microbiome isolé. Ce principe a pour objectif de réduire la complexité de la communauté microbienne d'origine et d'augmenter sa stabilité, tout en préservant certaines des interactions essentielles qui s'établissent entre les microbes et leurs hôtes.

Parmi les souches fongiques isolées, nous notons une présence significative de souches appartenant au complexe d'espèces *Fusarium*. La présence de plusieurs souches endophytes de *Fusarium* aux niveaux des racines saines de la variété *Florence Aurore* peut être troublante. Ces interactions asymptomatiques, nous obligent à réfléchir de nouveau sur la définition académique d'un « agent pathogène ». Ramenée aux fonctions et modalités trophiques des micro-organismes dans leur habitat naturel, quel qu'il soit (*ex- et in vivo*), cette définition reste floue en définitive, car la discrimination entre un agent pathogène et un agent non pathogène est basée sur sa capacité à provoquer ou non des symptômes morbides à la plante sur/dans laquelle il est installé (ou a été inoculé). Il est impossible de statuer de manière définitive sur la quelconque pathogénicité d'un micro-organisme en se basant uniquement sur son groupe d'appartenance, quand bien même celui-ci est étudié quasi exclusivement pour les agents phytopathogènes qu'il renfermerait. La virulence d'un micro-organisme repose sur un trait multifactoriel complexe et qui ne peut être exprimé qu'en présence d'une plante hôte « compatible ». Par ailleurs, il n'est pas improbable que certains *Fusarium* endophytes « asymptomatiques » peuvent présenter des aptitudes PGP et BCA, d'où l'importance de les tester également *in planta*.

Des analyses métagénomique et bioinformatique sont nécessaires pour mieux comprendre la richesse de la diversité des communautés bactériennes et fongiques qui compose et structure un microenvironnement, tout comme détecter leur évolution spatiale (au sein d'un organe par exemple) et temporelle (inter saison) et dévoiler les complexités associées aux interactions plante-microbes et les fonctionnalités potentielles qu'ils peuvent apporter à la plante.

L'effet bénéfique des endophytes bactériens et des six souches de *Trichoderma* observé dans des conditions de chambre de culture doit être vérifié en plein champ. En effet, dans un environnement perpétuellement changeant, de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques peuvent entraver -voire annihiler- l'efficacité et la reproductibilité d'action bénéfique d'un micro-organisme, limitant ainsi leur réussite d'utilisation en agriculture. Par ailleurs, la réponse à l'inoculation du sol par un PGPM peut également varier considérablement en fonction de l'espèce du microbe, de la densité de l'inoculant, du type de sol et de sa structure physico-chimique, et des conditions environnementales ambiantes.

Le potentiel biostimulateur des souches bénéfiques peut être également testé sur d'autres cultures, notamment des cultures céréalières comme le blé tendre et l'orge. Le potentiel bioprotecteur peut être aussi évalué contre d'autres champignons pathogènes de blé appartenant au genre *Fusarium* comme *F. graminearum*, ainsi que contre d'autres maladies *dévastatrices* du blé qui sévissent en Tunisie comme la septoriose, l'*helminthosporiose* et la rouille dont les agents responsables sont respectivement *Zymoseptoria tritici*, *Pyrenophora tritici-repentis* et *Puccinia striiformis*.

Enfin, la présence de plusieurs composés bioactifs a été dévoilée dans notre étude. Ces composés sont impliqués dans l'activité antagoniste des *Trichoderma* et dans l'inhibition de développement de *F. culmorum*, correspondant ainsi aux inhibiteurs bactériens retrouvés dans les fractions intracellulaires de *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus peoriae* et *Pantoea agglomerans* qui inhibent la germination des macroconidies et le développement des tubes germinatifs de *F. culmorum*. Ces composés organiques sont soit volatils dans la fraction aérienne, soit diffusibles dans le milieu gélosé. Ces composés sont précieux, et ils doivent être identifiés et caractérisés le plus finement possible pour leur utilisation optimale comme bioprotecteurs et/ou en combinaison avec d'autres microbes bénéfiques. Ces micro-organismes bénéfiques ainsi que leurs métabolites secondaires représentent ainsi une solution fiable et écologique qui peut répondre aux défis urgents d'une agriculture moderne et respectueuse de l'environnement.



**Poster  
et  
Congrès**

# Journées Annuelles 2021 de l'Ecole Doctorale SVSAE, Université Clermont Auvergne



## Study of the bacterial and fungal communities associated with Tunisian wheat landraces and their role in enhancing the resilience of modern cultivars against biotic stress



Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale JED (27, 28 mai 2021)

Mouadh SAADAOUJ<sup>1,2,3</sup>, Amadou Bamba NIANE<sup>1</sup>, Céline SAC<sup>1</sup>, Amélie COSTON<sup>1</sup>, Jérôme FRANCHEL<sup>1</sup>, Hatem CHAAR<sup>2</sup>, Noura OMRI BENYOUSSEF<sup>1</sup>, Mohamed KHARRAT<sup>3</sup>, Philippe LABEL<sup>1</sup>, Jean-Stéphane VENISSE<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, INRAE, PIAF, 63000 Clermont-Ferrand, France  
<sup>2</sup> University of Tunis El Manar, Tunisia  
<sup>3</sup> Field Crops Laboratory, National Agronomic Research Institute of Tunisia (INRAT), Ariana, Tunisia

### Abstract

The world production of wheat is threatened by various biotic and abiotic stresses. In sustainable wheat crop systems, the utilization of beneficial microorganisms isolated from local wheat varieties in field crops presents a promising alternative to conventional chemical pesticides for increasing yield. Traditional wheat varieties have adapted to local environmental conditions, partially due to their native microbial communities. The objective of this study is to characterize the diversity and community structure of fungi and bacteria associated with traditional wheat varieties. The ultimate goal is to provide candidate strains for future evaluation in promoting plant growth and/or biological control against major wheat diseases. We sampled two fields of Tunisian durum wheat varieties, namely Roumani and Jnah Khotifa, as well as one field of bread wheat variety, *Florence Aurore*, all grown in organic systems and displaying high relative resistance to drought and diseases. Fungi and bacteria were isolated using culture-dependent methods, and the isolated strains were identified through their ITS region or 16S rRNA gene. The results revealed diverse endophytes in wheat, including phytopathogens and potential beneficial bioagents, coexisting within various plant tissues (roots, leaves, and seeds). We are currently analyzing the beneficial effects of some strains in promoting plant growth and their mycoparasitic activity against certain fungal pathogens like *Fusarium culmorum*, *Zygomorpha tritici*, and *Helminthosporium tritici ripens* on modern and commercially available wheat genotypes, which will be discussed further.

### Background

The phyllosphere, encompassing all above-ground surfaces, and the rhizosphere, the narrow region of soil directly influenced by root secretions, host a diverse range of microorganisms. Within this microbial community, certain fungi and bacteria are non-pathogenic and often play essential roles in shaping the immediate environment and health of the host plant. These host-associated microorganisms can also be involved in global processes, such as contributing to the carbon and nitrogen cycles, making them valuable biological control agents. Therefore, comprehending the ecology of microorganisms associated with plants holds both scientific and economic significance. Wheat, as the world's largest cultivated crop, faces threats from both biotic and abiotic stresses at a time when the need for increased production is pressing. Leveraging microbiomes in wheat cultivation is a pivotal factor in enhancing crop productivity and sustaining soil health and the environment.

### Materials and Methods

#### Sampling

Field samplings were conducted at two different time periods: November and May 2020. The field is situated in Mateur, northern Tunisia, at coordinates latitude 36.924096 and longitude 9.699089, with an elevation of 133 meters above sea level. Plants from three wheat cultivars were collected at two growth stages: tillering and heading. These samples were carefully placed in plastic bags and stored at the Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT) for the isolation of fungi and bacteria.

#### Isolation of Fungi and Bacteria

Both roots and aerial parts, including spikes, leaves, stems, and seeds, underwent surface sterilization through sequential dips in 70% ethanol for 2 minutes, 0.5% NaOCl for 2 minutes, and 70% ethanol for 1 minute, followed by two rinses in sterile distilled water. Afterward, they were finely dissected using sterile scalpels. Each part was then placed in a Petri plate containing TSA and PDA culture media. For rhizospheric soil, we prepared serial dilutions from 1g of soil tightly adhering to the roots, and these dilutions were plated onto Petri dishes. All plates were incubated at 28° C until colonies appeared, at which point individual colonies were selected for further purification.

#### DNA Extraction and Molecular Identification

Genomic DNA from fungal isolates was extracted from fresh mycelium using the CTAB method. For grinding, two different methods were employed: cryogenic grinding with liquid nitrogen using a mortar and pestle, and grinding by rapid agitation with metallic balls in a bead beater. The ITS region was amplified using ITS1/ITS4 primers. Total genomic DNA of bacteria was extracted using the Phenol-Chloroform method, and the 16S rRNA gene was amplified using 27/1492R primers.

#### Evaluation of Isolated Strains for In Vitro Antagonism

Isolated fungi were assessed for in vitro antagonism using the dual culture technique. The isolated strain and the pathogenic fungus were inoculated on opposite sides in the center of a PDA Petri plate, with a 2 cm distance between them. The radial growth of the pathogenic fungus was measured, and the percentage inhibition of growth was calculated as follows: inhibition percentage =  $(R1 - R2) / R1 * 100$ , where R1 represents the colony radius of the pathogenic fungus in the control and R2 is the colony radius of the pathogenic fungus towards the antagonistic fungus.

### Results

#### Isolation and Global Diversity

Fungi and bacteria colonized the spike, root, and rhizospheric soil. In this study, a total of 24 fungal species and 31 bacterial species were isolated. The highest diversity and abundance of bacteria and fungi were found in the spike, with 12 bacterial species and 13 fungal species. Notably, three bacterial species (*Bacillus subtilis tequilensis* sp., *Bacillus megaterium*, and *Pseudomonas aeruginosa* sp.) were present in both the spike, root, and rhizospheric soil. However, for fungi, only *Cladosporium* sp. was identified in both the spike and rhizospheric soil. It's worth noting that comparing the proportion of bacterial to fungal species is challenging due to the isolation procedure, which favored bacteria over fungi.

#### Antagonistic activity

Three strains have demonstrated antagonistic effects. The most significant inhibition of pathogen growth was observed with *Trichoderma* sp., achieving an inhibition percentage of approximately 88% and 86.7% against *H. tritici* and *F. culmorum*, respectively. This behavior was further confirmed through microscopic analysis at the confrontation zone. *Mortierella alpina* and *Lecanicillium psalliotae*, on the other hand, exhibited effectiveness primarily against *H. tritici*.

#### Sampling

Tunisian field of wheat → Heading stage → Tillering stage

#### Isolation procedure

Spike Soil Root

#### Tunisian wheat varieties

Durum wheat Soft wheat

#### Macroscopic aspects of isolated strains

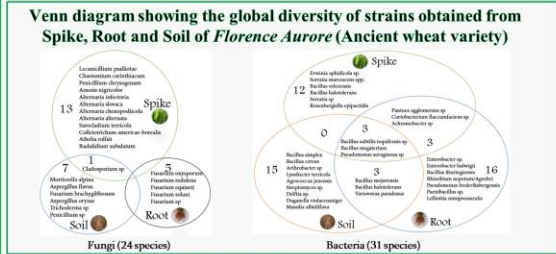
Bacteria on TSA medium Fungi on PDA medium

#### DNA extraction from Fungi

Grinding frozen samples with liquid nitrogen  
Grinding with metallic balls

#### Agarose gel electrophoresis (2%) of 16S rRNA gene for Bacteria (1500bp)

#### Agarose gel electrophoresis (2%) of ITS region for Fungi (500bp)



#### Biocontrol activity against *F. culmorum* and *Helminthosporium tritici*

**Trichoderma sp.**  
Inhibition zone 86.7% against *H. tritici*, 88% against *F. culmorum*

**Mortierella alpina**  
60.8% of inhibition (D4) against *H. tritici*

**Lecanicillium psalliotae**  
Inhibition zone 88% against *H. tritici*

**Microscopic observation of the area of confrontation (x100)**  
 Shows *Trichoderma* sp. hyphae and *H. tritici* hyphae.

# 13th International Conference of the French Society of Plant Biology August 29 - 31 2022, Montpellier - France



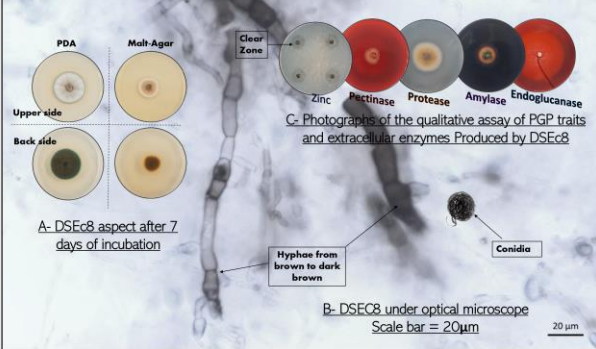
## EFFECT OF SEED BIOPRIMING WITH A DARK SEPTATE ENDOPHYTE STRAIN ON WHEAT DEVELOPMENT, IMMUNE PERFORMANCE AND DAMPING-OFF BIOCONTROL CAUSED BY *FUSARIUM CULMORUM*

Mouadh SAADAOU<sup>1,2,6</sup>, Amadou Bamba NIANE<sup>3</sup>, Amélie COSTON<sup>1</sup>, Céline SAC<sup>1</sup>, Caroline SAVEL<sup>1</sup>, Mohamed FAIZE<sup>3</sup>, Magdalena FRAC<sup>4</sup>, Hatem CHAAR<sup>5,6</sup>, Ludovic BONHOMME<sup>7</sup>, Philippe LABEL<sup>1</sup>, Jean-Stéphane VENISSE<sup>1</sup>.

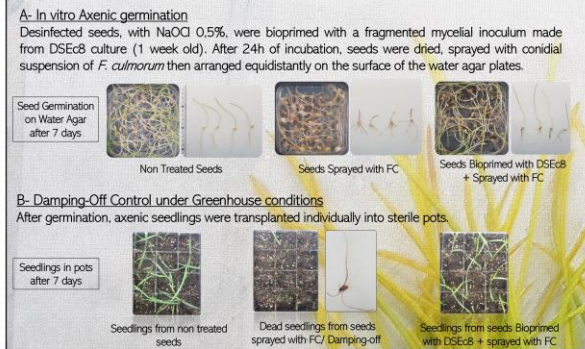
<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, INRAE, PIAF, 63000 Clermont-Ferrand, France ; <sup>2</sup> Université de Tunis El Manar, Campus Universitaire Farhat Hached, B.P. n° 94 - ROMMANA, Tunis 1068, Tunisie ; <sup>3</sup> Laboratory of Plant Biotechnology, Ecology and Ecosystem Valorization, Faculty of Sciences, University Chouaib Doukkali, El Jadida 24000, Morocco ; <sup>4</sup> Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doswiadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland ; <sup>5</sup> National Institute of Agronomy of Tunisia (INAT), <sup>6</sup> Field Crops Laboratory, National Institute for Agricultural Research of Tunisia (INRAT), Hedi Karray Street, 1004, El Menzah, Ariana, Tunisia ; <sup>7</sup> Université Clermont Auvergne, INRAE, GDEC, 63000, Clermont-Ferrand, France.

*Fusarium culmorum* (FC) is the responsible agent for Fusarium seedling blight (FSB) and Fusarium head blight (FHB) diseases of cereals. The control of FHB has gained lots of attention due to the risk of mycotoxin contamination of grains while FSB, foot rot and damping-off diseases may cause serious damage to growing seedling, reducing then plant establishment and grain yield. Therefore, the Biological Control Agents (BCAs) from microbiote communities represent an alternative and eco-friendly way to protect cereal crops. The dark septate endophytes (DSE) are root endophyte fungus well characterized, but their abilities to promote plant growth and immune responses against cryptogamic diseases are not well studied in wheat. A DSE strain (DSEc8) was isolated from healthy root tissues of *Florence Aurore*, an old bread wheat variety. The aim of this study was to assess (i) the effect of DSEc8 on germination and wheat seedling growth (ii), its biocontrol potential against *F. culmorum* (in vitro and in planta), (iii) and its ability to locally (roots and leaves) modulate genes related to immunity. Results showed that DSEc8 significantly inhibited *F. culmorum* growth by using dual culture method, due to the synthesis of AntiMicrobial Compounds (AMCs). In planta, DSEc8 developed a strong protective role against *F. culmorum* infestations. This resistance is combined with significant elicitation of genes involved in plant immunity. This finding makes DSEc8 a reliable BCA strain for use in agriculture, including the control of seedling fatal diseases caused by *Fusarium* in wheat crops.

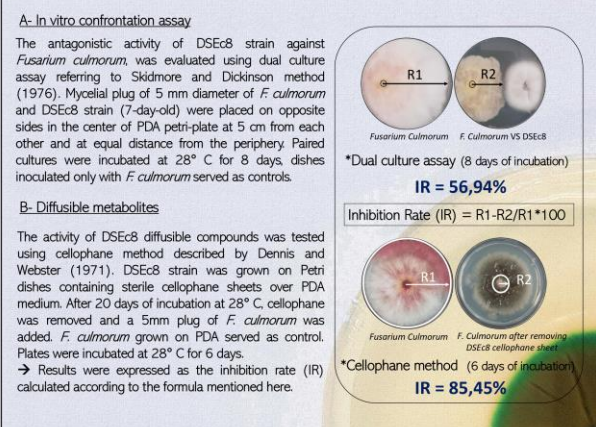
### 1- DSEc8 : Macroscopic aspect, Microscopic observation, Biochemical characterisation and PGP traits



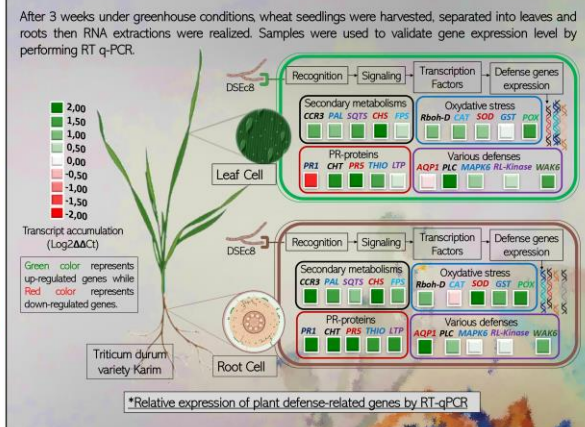
### 3- Effect of Seed-Biopriming with DSEc8 on Germination and Seedling growth of durum wheat seeds inoculated by *Fusarium culmorum*



### 2- Antagonistic activity of DSEc8 against *Fusarium culmorum* « in vitro »



### 4- Immune performance and defense genes expression induced by DSEc8







## **Références**

## - A -

- Abbassenne F, Bouzerzour H, Hachemi L.** 1998. Phénologie et production du blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone semi-aride. *Ann. Agron. INA*, 18: 24-36.
- Al-Mutar DMK, Alzawar NSA, Noman M, et al.** 2023. Suppression of fusarium wilt in watermelon by *Bacillus amyloliquefaciens* DHA55 through extracellular production of antifungal Lipopeptides. *Journal of Fungi* 9(3): 336.
- Al-Rashdia FKH, Al-Sadi AM, Al-Riyamyb BZ, Maharachchikumburac SSN, Al-Ruqaishid HK, Velazhahan R.** 2020. *Alternaria alternata* and *Neocosmospora* sp. from the medicinal plant *Euphorbia larica* exhibit antagonistic activity against *Fusarium* sp., a plant pathogenic fungus. *All Life* 13:223-232. <https://doi.org/10.1080/26895293.2020.1759702>
- Adam L, Sommerville SC.** 1996. Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 34: 13-26.
- Abdallah DB, Frikha-Gargouri O, Tounsi S.** 2018. Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. *Biological Control*, 124: 61-67.
- Abdul M, Nurul A, Ilakiya Sharanee K, Kalaivani N.** 2020. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3): 963
- Abedinzadeh M, Etesami H, Alikhani HA.** 2019. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. *Biotechnology Report* 21:e00305.
- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW.** 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 58: 921-929.
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. T., Weigel, D., & Kemen, E. M.** 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS biology*, 14(1), e1002352.
- Ahmadi N, Chantereau J, Hekimian Lethève C, et al.** 2002. Agriculture spéciale. Les plantes comestibles: les céréales In : Mémento de l'agronome. Montpellier: CIRAD, p. 777-829.
- Aidani H.** 2015. Effet des attaques de Capucin des grains (*Rhizopertha dominica*) sur les céréales stockées « Estimation sur la perte pondérale et le pouvoir germinatif Cas de blé dur dans la région de Tlemcen ». Mémoire de master en Agronomie Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen : 15p.
- Ali MA, Naveed M, Mustafa A, et al.** 2017. The good, the bad, and the ugly of rhizosphere microbiome. In: Kumar V, Kumar M, Sharma S, et al. (Eds), *Probiotics and plant health*. Singapore: Springer, 253-290.
- Alley MM, Scharf P, Brann DE, et al.** 1999. Nitrogen management for winter wheat: principles and recommendations. *Crop and Soil Environmental science* 25: 424-429.
- Altieri MA, Nicholls CI, Fritz MA.** 2005. Manage insects on your farm: a guide to ecological strategies. Sustainable Agriculture Network, Beltsville, MD.
- Altieri MA, Farrell JG, Hecht SB, et al.** 2018. The Agroecosystem: Determinants, resources, processes, and sustainability. *Agroecology. CRC Press*, 41-68.
- Amira, M. B., Lopez, D., Mohamed, A. T., Khouaja, A., Chaar, H., Fumanal, B., ... & Venisse, J. S.** 2017. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control*, 110, 70-78.
- Ammar K, Gharbi MS, Deghais M.** 2011. Wheat in Tunisia. In: The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding. *Lavoisier* 2: 443-463.
- Andrews JH.** 1992. Biological-control in the phyllosphere. *Annu Rev Phytopathol.* 30: 603-635.
- D'Angelo DL, Bradley CA, Ames KA, et al.** 2014. Efficacy of fungicide applications during and after anthesis against *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in soft red winter wheat. *Plant disease*, 98(10): 1387-1397.
- Antalová Z, Bleša D, Martinek P, Matušinsky P.** 2020. Transcriptional analysis of wheat seedlings inoculated with *Fusarium culmorum* under continual exposure to disease defence inductors. *PLoS One* 15(2): e0224413.
- Araujo R, Dunlap C, Barnett S, Franco CMM.** 2019. Decoding wheat endosphere rhizosphere microbiomes in *Rhizoctonia solani*-infested soils challenged by *Streptomyces* biocontrol agents. *Front Plant Sci*;10:1038. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01038>.

- Ardisson M.** 2019. Histoire de la domestication de *Triticum turgidum* : la capture d'exons au service de l'étude de la diversité génétique. Génétique des populations [q-bio.PE]. 35 pages.
- Awad-Allah EFA, Mohamed IAA, Allah SFAA, et al.** 2022. *Trichoderma* Species: An Overview of Current Status and Potential Applications for Sustainable Agriculture. *Indian Journal of Agricultural Research* 1: 1-10.

## - B -

- Babu, A. G., Kim, S. W., Yadav, D. R., Hyum, U., Adhikari, M., and Lee, Y. S.** 2015. *Penicillium menonorum*: a novel fungus to promote growth and nutrient management in cucumber plants. *Mycobiology* 43, 49-56. doi: 10.5941/MYCO.2015.43.1.49
- Bachta MS.** 2011. La céréaliculture en Tunisie : une politique de régulation à repenser. Paris (France) : CIHEAM. 19 pages. (Notes d'analyse du CIHEAM, n. 64). <http://www.ciheam.org/images/CIHEAM/PDFs/Observatoire/NAN/nan64.pdf>
- Bahlouli F, Bouzerzour H, Benmahammed A.** 2005. Selection of stable and high yielding cultivar of durum wheat under semi – arid conditions. *Pakistan Journal of Agronomy* 28: 360-365.
- Baker CJ, Orlandi EW.** 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321.
- Bakker MG, Manter DK, Sheflin AM, Weir TL, Vivanco JM.** 2012. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil.* 360: 1-13.
- Baldy C.** 1984. Utilisation efficace de l'eau par la végétation en climats méditerranéens. *Bull. Soc. Boton. Fr* 131: 49-499.
- Baldy C.** 1993. Progrès récents concernant l'étude du système racinaire du blé (*Triticum* sp). *Ann. Agron.* (Paris). 241-276.
- Banerjee, S., Schlaeppli, K., and van der Heijden, M. G. A.** 2018. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 567-576. doi: 10.1038/s41579-018-0024-1
- Barra P, Inostroza NG, Sobarzo JA, Mora ML.** 2014. Formulation of bacterial consortia from avocado (*persea americana* mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. *Appl Soil Ecol* 102(2016):80-91
- Barraza A, Vizuet-de-Rueda JC, Alvarez-Venegas R.** 2020. Highly diverse root endophyte bacterial community is driven by growth substrate and is plant genotype-independent in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Peer J* 8: e9423.
- Bateman GL, Murray G.** 2001. Seasonal variation in population of *Fusarium* species in wheat-field soil. *Applied Soil Ecology* 18: 117-128.
- Battu L, Reddy MM, Goud BS, et al.** 2017. Genome inside genome: NGS based identification and assembly of endophytic *Sphingopyxis granuli* and *Pseudomonas aeruginosa* genomes from rice genomic reads. *Genomics* 109: 141-146.
- Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ.** 2013. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nat. Clim. Change* 3: 985-988.
- Beccari G, Covarelli L, Nicholson P.** 2011. Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60(4): 671-684.
- Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, et al.** 2010. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* 100: 444-453.
- Bednarek P, Osbourn A.** 2009. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324: 746-748.
- Bednarek P, Schulze-Lefert P.** 2009. Role of plant secondary metabolites at the host pathogen interface. In J Parker, ed, Molecular aspect of plant disease resistance. *Annual Plant Reviews* 34: 220-260.
- Bejarano-Bolívar AA, Lamelas A, Aguirre von Wobeser E, et al.** 2021. Shifts in the structure of rhizosphere bacterial communities of avocado after *Fusarium* dieback. *Rhizosphere* 18: 100333.
- Belaïd D.** 1986. Aspects de la céréaliculture Algérienne. Ed .OPU, Alger, 207 pages.
- Belimov AA, Hontzeas N, Safranova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, et al.** 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol Biochem*;37:241-50.

- Bello MGD, Knight R, Gilbert JA, Blaser MJ.** 2018. Preserving microbial diversity. *Science*. 362:33–4.
- Ben Hamouda M, Ben Youssef S, Bedhief S, et al.** 2016. Status of Agricultural Innovations, Innovation Platforms, and Innovations Investment in Tunisia. PARI project country report: Republic of Tunisia. *Forum for Agricultural Research in Africa*: 21-25.
- Benitez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC.** 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Barker PAHM.** 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17: 478-486.
- Berg G.** 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 84:11–8.
- Berg G, Rybakova D, Grube M, Köberl M.** 2016. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J Exp Bot*. 67:995–1002.
- Berg G, Raaijmakers JM.** 2018. Saving seed microbiomes. *ISME J*. 12:1167–70.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Bertheloot J.** 2009. Nitrogen distribution within wheat plants (*Triticum aestivum* L.) after flowering: a dynamic model based on a functional-structural approach. Doctoral dissertation, AgroParisTech. 128 pages.
- Bertin C, Yang XH, Weston LA.** 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256: 67-83.
- Bhattacharyya P, Jha D.** 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4):1327–1350.
- Bienert GP, Chaumont F.** 2014. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta (BBA) Gen Subj* 1840: 1596-1604.
- Bino RJ, Hall RD, Fiehn O, et al.** 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science* 9: 418-425.
- de Boer W, Verheggen P, Klein Gunnewiek PJ, et al.** 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied and environmental microbiology* 69(2): 835-844.
- Bloembergen GV, Lugtenberg BJJ.** 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol*. 4: 343-350.
- Boamah, S., Zhang, S., Xu, B., Li, T., & Calderón-Urrea, A.** 2021. *Trichoderma longibrachiatum* (TG1) enhances wheat seedlings tolerance to salt stress and resistance to *Fusarium pseudograminearum*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 741231.
- Boller EF, Häni F, Poehling HM.** 2004. Ecological infrastructures: ideabook on functional biodiversity at the farm level, temperate zones of Europe. IOBCwprs, Commission on Integrated Production Guidelines and Endorsement, Switzerland.
- Bolot S, Abrouk M, Masood-Quraishi U, et al.** 2009. The 'inner circle' of the cereal genomes. *Current opinion in plant biology* 12(2): 119-125.
- Bonjean AP, Angus WJ.** 2001. *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding*. Paris: Lavoisier Publishing.
- Boyardieu J.** 1997. *Blé tendre. Techniques agricoles*. Editions Techniques Agricoles. Fascicule 2020.
- Brauer VS, Rezende CP, Pessoni AM, et al.** 2019. Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules* 9: 521.
- Buckler ES, Thornsberry JM, Kresovich S.** 2001. Molecular Diversity, Structure and Domestication of Grasses. *Genetics Research* 77: 213-218.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, et al.** 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807-838.
- Burgess LW.** 2011. Foot, crown, and root rots of cereals - insidious diseases of global importance: A Tunisian perspective. 2011. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 6 (Guest Editorial).
- Busby PE, Soman C, Wagner MR, Friesen ML, Kremer J, Bennett A, et al.** 2017. Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLOS Biol*. 15:e2001793.

## - C -

- Chang YC, Chang YC, Baker R, et al.** 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70: 145–148.
- Chen Y, Wang J, Yang N, et al.** 2018. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation. *Nature communications* 9(1): 3429.
- Chen J, Sharifi R, Khan MSS, et al.** 2022. Wheat microbiome: Structure, dynamics, and role in improving performance under stress environments. *Frontiers in Microbiology* 12, 821546.
- Chimwamurombe PM, Grönemeyer JL, Reinhold-Hurek B.** 2016. Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. *FEMS Microbiol Ecol*;92: fiw083
- Clement G, et Prats J.** 1970. Les céréales. Collection d'enseignement agricole. 2<sup>ème</sup> Ed. 351 pages.
- Comby M, Lacoste S, Baillieux F, et al.** 2016. Spatial and temporal variation of cultivable communities of co-occurring endophytes and pathogens in wheat. *Frontiers in Microbiology* 7, 403.
- Compant S, et al.** 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Conlon, B. H., Schmidt, S., Poulsen, M., & Shik, J. Z.** 2022. Orthogonal protocols for DNA extraction from filamentous fungi. *STAR protocols*, 3(1), 101126.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Val, E. K., & Larsen, J.** 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4), fiw036.
- Cook RJ.** 1968. Fusarium root and foot rot of cereals in the Pacific Northwest. *Phytopathology* 58: 127-131.
- Cullen MG, Thompson LJ, Carolan JC, et al.** 2019. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. *PLoS ONE* 14: e0225743.

## - D -

- Daguerre Y, Siegel K, Edel-Hermann V, Steinberg C.** 2014. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal biology reviews* 28(4): 97-125.
- Day, L., Augustin, M. A., Batey, I. L., & Wrigley, C. W.** (2006). Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in food science & technology*, 17(2), 82-90.
- Dean R, Van Kan JL, Pretorius ZA, et al.** 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414–430.
- De Palma, M., Salzano, M., Villano, C., Aversano, R., Lorito, M., Ruocco, M., ... & Tucci, M.** 2019. Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. *Horticulture research*, 6.
- Dib H.** 2010. Rôle des ennemis naturels dans la lutte biologique contre le puceron cendré, *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) en vergers de pommiers. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 125 pages.
- Dixon RA, Strack D.** 2003 Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry* 62: 815-816.
- Dodds PN, Rathjen JP.** 2010. Plant Immunity: Towards an Integrated View of Plant–Pathogen Interactions. *Nature Reviews Genetics* 11 (8): 539-548.
- Donn S, Kirkegaard JA, Perera G, Richardson AE, Watt M.** 2014. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. *Environ Microbiol*;17 (3):610–21.
- Dubcovsky J, Echaide M, Giancola S, et al.** 1997. Seed-storage-protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1169-1180.
- Ducasse A.** 2021. Immunité du blé dur, modulation par la génétique et l'environnement. Sciences. Mémoire de Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. 82 pages.
- Dunham Trimmer LLC.** 2017. Biological control global market overview.

**Dupré JO, O'Malley MA.** 2009. Varieties of living things: life at the intersection of lineage and metabolism. In: Normandin S, Wolfe C, editors. *Vitalism and the Scientific Image in Post-Enlightenment Life Science; History, Philosophy and Theory of the Life Sciences*. Dordrecht: *Springer*; p. 1800–2010.

## - E -

- Ehsanfar, S., & Modarres-Sanavy, S. A.** 2005. Crop protection by seed coating. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(3), 225-229.
- Elad, Y., Chet, I., & Henis, Y.** 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9, 59-67.
- El Felah M, Gharbi MS, Ben Ghanem H, Elloumi M.** 2015. Les céréales en Tunisie entre mythe et réalité. *Annales de l'INRAT, 2ème Numéro Spécial Centenaire, Volume 88*.
- ELD Initiative.** 2015. Report for Policy and Decision Makers: Reaping Economic and Environmental Benefits From Sustainable Land Management (Bonn, Germany: Initiative and Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH).
- Eljounaidi K, Lee SK, Bae HH.** 2016. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases-Review and future prospects. *Biological Control* 103: 62-68.
- Esparza-Reynoso, S., Ruíz-Herrera, L. F., Pelagio-Flores, R., Macías-Rodríguez, L. I., Martínez-Trujillo, M., López-Coria, M., ... & López-Bucio, J.** 2021. *Trichoderma atroviride*-emitted volatiles improve growth of *Arabidopsis* seedlings through modulation of sucrose transport and metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 44(6), 1961-1976.
- Evers, AD, Blakeney AB, O'Brien L.** 1999. Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 629-650.
- Evangelisti S, Lettieri P, Borello D, Clift R.** 2014. Life cycle assessment of energy from waste via anaerobic digestion: a UK case study. *Waste management* 34(1): 226-237.

## - F -

- Fadiji AE, Babalola OO.** 2020. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8, 467.
- FAO.** 2020. FAOSTAT statistics database: Food balance sheets. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> (Accessed April 25th, 2022).
- Faris JD.** 2014. Wheat domestication: Key to agricultural revolutions past and future. *Genomics of Plant Genetic Resources: Volume 1. Managing, sequencing and mining genetic resources*, 439-464.
- Fasusi OA, Cruz C, Babalola OO.** 2021. Agricultural sustainability: Microbial biofertilizers in rhizosphere management. *Agriculture* 11:163.
- Feldman M, Sears ER.** 1981. The wild gene resources of wheat. *Sci. Am.* 244: 98-108.
- Flor HH.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol.* 9: 275-296.

## - G -

- Gadjev I, Stone JM, Gechev TS.** 2008. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 270. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp 87-144.
- Gams, W., & Bissett, J.** 2002. Morphology and identification of *Trichoderma* and *Gliocladium*, 3-31.
- Gardiner DM., Kazan K., Manners JM.** 2009. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal genetics and biology* 46(8): 604-613.
- Gardner JM, Feldman AW, Zablutowicz RM.** 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl Environ Microbiol* 43:1335–1342.
- Gargouri S, Hajlaoui MR, Guermech A, Marrakchi M.** 2001. Identification des espèces fongiques associées à la pourriture du pied du blé et étude de leur répartition selon les étages bioclimatiques en Tunisie. *Bull.*

OEPP/EPPO Bull., 31, 499–503.

- Gate P.** 1995. Ecophysiologie du blé de la plante à la culture. Paris, Lavoisier Tech & Doc - ITCF. 351 pages.
- Gdanetz K, Trail F.** 2017. The wheat microbiome under four management strategies, and potential for endophytes in disease protection. *Phytobiomes J*;1:158–68.
- Gilbert JA, Meyer F, Jansson J, Gordon J, Pace N, Tiedje J, Ley R, Fierer N, Field D, Kyrpides N, Glöckner FO, Klenk HP, Wommack KE, Glass E, Docherty K, Gallery R, Stevens R, Knight R.** 2010. The Earth Microbiome Project: meeting report of the "1st EMP meeting on sample selection and acquisition" at Argonne National Laboratory October 6 2010. *Stand Genomic Sci.* 3: 249-253.
- Giorgi F.** 2006. Climate change hot-spots'; geophysical Resources Letters, 33: 707–715. GTZ. 2007. Adaptation to climate change: development of a nation-al strategy for agriculture, ecosystems and water resources in Tunisia 2005 to December 2007. 3p.
- Gontia-Mishra I, Sapre S, Kachare S, Tiwari S.** 2017. Molecular diversity of 1- aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing PGPR from wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere. *Plant Soil*;414:213–27.
- Gouda S, Das G, Sen SK, et al.** 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology* 7:1538.
- Graaff MA, Six J, Jastrow JD, et al.** 2013. Variation in root architecture among switchgrass cultivars impacts root decomposition rates. *Soil Biol Biochem* 58: 198-206.
- Griffiths SM, Galambao M, Rowntree J, et al.** 2020. Complex associations between cross-kingdom microbial endophytes and host genotype in ash dieback disease dynamics. *Journal of Ecology* 108: 291-309.
- Grignac P.** 1965. Contribution d l'étude de *Triticum durum* (Desf.) Thèse, Fac. Sci. Toulouse : 152 pages.
- Gromadzka K, Chelkowski J, Popiel D, et al.** 2009. Solid substrate bioassay to evaluate the effect of *Trichoderma* and *Clonostachys* on the production of zearalenone by *Fusarium* species. *World Mycotoxin Journal* 2(1): 45-52.
- Guo, Y., Ghirardo, A., Weber, B., Schnitzler, J. P., Benz, J. P., & Rosenkranz, M.** 2019. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in microbiology*, 10, 891.
- Gusta LV, O'connor BJ, Lafond GL.** 1999. Phosphorus and nitrogen effects on the freezing tolerance of Norstar winter wheat. *Canadian journal of plant science* 79(2): 191-195.
- Gutleben J, De Mares MC, van Elsas JD, et al.** 2018. The multiomics promise in context: from sequence to microbial isolate. *Critical Reviews in Microbiology* 44(2): 212–29.

## - H -

- Haider N.** 2012. Evidence for the Origin of the B Genome of Bread Wheat Based on Chloroplast DNA, Turk. *J. Agric. For.* 36: 13-25.
- Halifu, S., Deng, X., Song, X., Song, R., & Liang, X.** 2020. Inhibitory mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. *Plants*, 9(7), 912.
- Hallmann, J., Berg, G., & Schulz, B.** 2006. Isolation procedures for endophytic microorganisms. In *Microbial root endophytes* (pp. 299-319). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW.** 2011. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43(10): 895-914.
- Hamadache AM.** 2001. Manuel illustré des grandes cultures à l'usage des valorisateurs et techniciens de l'agriculture. Stades et variétés de blé, ITGC, Alger, 22 pages.
- Hameed S., Yasmin S., Malik K. A., Zafar Y., Hafeez F. Y.** (2004). Rhizobium, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biol. Fertil. Soils* 39 179–185 10.1007/s00374-003-0697-z
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Van Elsas JD.** 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16: 463-71.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A et al.** 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2:43-56.
- Hartmann, A., Rothballer, M., Hense, B. A., & Schröder, P.** 2014. Bacterial quorum sensing compounds

- are important modulators of microbe-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 5, 131.
- Hassani, M. A., Duran, P., and Hacquard, S.** 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6:58. doi: 10.1186/s40168-018-0445-0
- Hassani MA, Özkurt E, Franzenburg S, Stukenbrock EH.** 2020. Ecological assembly processes of the bacterial and fungal microbiota of wild and domesticated wheat species. *Phytobiomes J* 4: 217-224.
- Haudry A, Cenci A, Ravel C, et al.** 2007. Grinding up Wheat: A Massive Loss of Nucleotide Diversity Since Domestication. *Mol Biol Evol* 24, 1506–1517.
- Hazmoune T.** 1994. Contribution à la caractérisation de l'appareil racinaire de quelques variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) en relation avec les composants de rendement. Thèse Magistère. Université, Batna, 80 pages.
- Hedden P.** 2003. The genes of the green revolution. *Trends Genet.* 19(1): 5-9.
- Heit S.** 2018. Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse de doctorat, Université de Lorraine. 158 pages.
- Heller F, Pusic E, Strauss G, Wilpert B.** 1998. Organizational Participation: Myth and Reality, Oxford: Oxford University Press.
- Hellin P, King R, Urban M, et al.** 2018. The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (*FcABC1*). *Frontiers in Microbiology* 9: 1385.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E.** 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.
- Hirsch PR, Mauchline T.** 2014. Who's who in the plant root microbiome? *Nat Biotechnol* 30(10):961–962. <https://doi.org/10.1038/nbt.2387>
- Hirt H.** 2020. Healthy soils for healthy plants for healthy humans: How beneficial microbes in the soil, food and gut are interconnected and how agriculture can contribute to human health. *EMBO Report* 21: e51069.
- Hooks KB, O'Malley MA.** 2017. Dysbiosis and its discontents. *mBio.* 8:e01492–17.
- Hollaway GJ, Evans ML, Wallwork H, et al.** 2013. Yield Loss in Cereals, Caused by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum*, Is Related to Fungal DNA in Soil Prior to Planting, Rainfall, and Cereal Type. *Plant Disease* 97: 977-982.
- Hřivná L, Kotková B, Burešová I.** 2015. Effect of sulphur fertilization on yield and quality of wheat grain. *Cereal Research Communications* 43(2): 344-352.
- Huang Y, Kuang Z, Wang W, Cao L.** 2016. Exploring potential bacterial and fungal biocontrol agents transmitted from seeds to sprouts of wheat. *Biol Control*;98:27–33.
- Humphreys J, Cooke BM, Storey T.** 1998. Effects of seed-borne *Microdochium nivale* on establishment and population density at harvest of winter-sown oats. *Plant Var. Seeds* 11: 83-90.

- I -

- Ilham B, Noureddine C, Philippe G, et al.** 2019. Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis thaliana* by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* used as seed treatments. *Agriculture* 9(8): 166.
- Illescas, M., Pedrero-Méndez, A., Pitorini-Bovolini, M., Hermosa, R., & Monte, E.** 2021. Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. *Pathogens*, 10(8), 991.
- Intana W, Kheawleng S, Sunpapao A.** 2021. *Trichoderma asperellum* T76-14 released volatile organic compounds against postharvest fruit rot in muskmelons (*Cucumis melo*) caused by *Fusarium incarnatum*. *Journal of Fungi* 7(1): 46.
- IPBES 2019 Report.** <https://ip.panda.org/ipbes>. Accessed 5 Aug 2019



## - J -

- Jackowiak H, Packa D, Wiwart M, Perkowski J.** 2005. Scanning electron microscopy of Fusarium damaged kernels of spring wheat. *International journal of food microbiology* 98(2): 113-123.
- Jäger, T., Mokos, A., Prasianakis, N. I., & Leyer, S.** 2022. first\_page settings Order Article Reprints Open AccessArticle Pore-Level Multiphase Simulations of Realistic Distillation Membranes for Water Desalination. *Membranes*.
- Jha, P., & Kumar, A.** 2009. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylooxidans* from wheat plant. *Microbial ecology*, 58, 179-188.
- Jeffries, P.** (1995). Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian journal of botany*, 73(S1), 1284-1290.
- Ji, C., Liu, Z., Hao, L., Song, X., Wang, C., Liu, Y., ... & Liu, X.** 2020. Effects of *Enterobacter cloacae* HG-1 on the nitrogen-fixing community structure of wheat rhizosphere soil and on salt tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1094.
- Jochum CC, Osborne LE, Yuen GY.** 2006. Fusarium head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3. *Biol Control* 39:336–344
- Johnston-Monje D, Raizada MN.** 2011. Plant and endophyte relationships. *Comprehensive Biotechnology*. 4:713-727.
- Jog R, Nareshkumar G, Rajkumar S.** 2012. Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. *J Appl Microbiol*;113:1154–64
- Joo, J. H., & Hussein, K. A.** 2022. Biological control and plant growth promotion properties of volatile organic compound-producing antagonistic *Trichoderma* spp. *Frontiers in Plant Science*, 13, 897668.
- Jones JD, Dangl JL.** 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Junker C, Draeger S, Schulz B.** 2012. A new line - endophytes or pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecol* 5:657–662. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.002>

## - K -

- Karou M, Haffid R, Smith DN, Samir K.** 1998. Roots and shoot growth water use and water use efficiency of spring durum wheat under early – season drought. *Agronomie* 18: 182-186.
- Kauffmann S, Dorey S, Fritig B.** 2001. Les stratégies de défense. *Pour la Science* janvier : 116-121.
- Kaur S, Samota MK, Choudhary M, et al.** 2022. How do plants defend themselves against pathogens- Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 28 :485–504.
- Kavamura VN, Hayat R, Clark IM, Rossmann M, Mendes R, et al.** 2018. Inorganic nitrogen application affects both taxonomical and predicted functional structure of wheat rhizosphere bacterial communities. *Front Microbiol.* 9:1074. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01074>.
- Kavamura VN, Robinson RJ, Hayat R, et al.** 2019. Land management and microbial seed load effect on rhizosphere and endosphere bacterial community assembly in wheat. *Frontiers in Microbiology* 10:2625.
- Kavamura VN, Robinson RJ, Hughes D, et al.** 2020. Wheat dwarfing influences selection of the rhizosphere microbiome. *Sci Rep* 10: 1452.
- Kavamura VN, Mendes R, Bargaz A, Mauchline TH.** 2021. Defining the wheat microbiome: Towards microbiome-facilitated crop production. *Computational and structural biotechnology journal* 19: 1200-1213.
- Keswani, C., Singh, S. P., & Singh, H. B.** 2013. A superstar in biocontrol enterprise: *Trichoderma* spp. *Biotech Today*, 3(2), 27-30.
- Kent AD, Triplett EW.** 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu Rev Microbiol.* 56: 211-236.
- Khalid, A., Hameed, A., & Tahir, M. F.** 2023. Wheat quality: A review on chemical composition, nutritional attributes, grain anatomy, types, classification, and function of seed storage proteins in bread making quality. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1053196.
- Khan MR., Fischer S, Egan D, Doohan FM.** 2006. Biological control of Fusarium seedling blight disease of wheat and barley. *Phytopathology* 96(4): 386-394.

- Khan, M. S., Gao, J., Munir, I., Zhang, M., Liu, Y., Xue, J., & Zhang, X.** 2021. Characterization of endophytic fungi, *Acremonium* sp., from *Lilium davidii* and analysis of its antifungal and plant growth-promoting effects. *BioMed Research International*.
- Khemir E, Chekali S, Souissi A, Gharbi MS.** 2018. Sur-vival of *Fusarium culmorum*, causal agent of foot and root rot of cereals, on wheat, barley and oat residues in Tunisia. *Annales de L'INRAT* 91: 162–172.
- Khemir E, Chekali S, Moretti A, et al.** 2020. Impacts of previous crops on inoculum of *Fusarium culmorum* in soil, and development of foot and root rot of durum wheat in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* 59(1): 187-201.
- Kim SH, Vujanovic V.** 2016. Relationship between mycoparasites lifestyles and biocontrol behaviors against *Fusarium* spp. and mycotoxins production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 5257-5272.
- Kinnunen-Grubb M, Sapkota R, Vignola M, Nunes IM, Nicolaisen M.** 2020. Breeding selection imposed a differential selective pressure on the wheat root-associated microbiome. *FEMS Microbiol Ecol* ;96(11):f1aa196. [https:// doi.org/10.1093/femsec/f1aa196](https://doi.org/10.1093/femsec/f1aa196).
- Kjeldgaard B, Neves AR, Fonseca C, et al.** 2022. Quantitative high-throughput screening methods designed for identification of bacterial biocontrol strains with antifungal properties. *Microbiology Spectrum* 10(2): e01433-21.
- Kobayashi I, Murdoch LJ, Hardham AR, Kunoh H.** 1995. Cell biology of early events in the plant resistance response to infection by pathogenic fungi. *Canadian journal of botany* 73(S1): 418-425.
- Konopka A.** 2009. What is microbial community ecology? *ISME J.* 3:1223–30.
- Kopittke PM, Menzies NW, Wang P, et al.** 2019. Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International* 132: 105078.
- Kthiri Z Ben Jabeur M Machraoui M et al.** 2020. Coating seeds with *Trichoderma* strains promotes plant growth and enhance the systemic resistance against *Fusarium* crown rot in durum wheat. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30: 139.
- Kthiri Z Ben Jabeur M Harbaoui K et al.** 2021. Comparative Performances of Beneficial Microorganisms on the Induction of Durum Wheat Tolerance to *Fusarium* Head Blight. *Microorganisms* 9: 410.
- Kumar J, Singh D, Ghosh P, et al.** 2017. Endophytic and epiphytic modes of microbial interactions and benefits. *Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives*. Singapore: Springer, 255-771.
- Kumar A, Verma JP.** 2018. Does plant-Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiology Research* 207: 41-52.
- Kushwaha P, Kashyap PL, Bhardwaj AK, et al.** 2020. Bacterial endophyte mediated plant tolerance to salinity: Growth responses and mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 36:26.

## - L -

- Lepoivre P.** 2003. *Phytopathologie. Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Presses agronomiques de Gembloux. Editeur, de Boeck Supérieur 426 pages.
- Leslie, J.F., and Summerell, B.A.** (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (Ames, Iowa: Wiley-Blackwell).
- Li G, Chen T, Zhang Z, et al.** 2020. Roles of aquaporins in plant-pathogen interaction. *Plants* 9:1134.
- Li, S., Shang, X. J., Luo, Q. X., Yan, Q., & Hou, R.** 2023. Effects of the dual inoculation of dark septate endophytes and *Trichoderma koningiopsis* on blueberry growth and rhizosphere soil microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(2), fiad008.
- Li, C., Lin, F., Sun, W., Yuan, S., Zhou, Z., Wu, F. G., & Chen, Z.** 2018. Constitutive hyperproduction of sorbicillinoids in *Trichoderma reesei* ZC121. *Biotechnology for biofuels*, 11, 1-16.
- Liu HW, Carvalhais LC, Crawford M, et al.** 2017. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology* 8: 2552.
- Lutz MP., Feichtinger G, Défago G, Duffy B.** 2003. Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6): 3077-3084.

## - M -

- Macías-Rodríguez, L., Guzmán-Gómez, A., García-Juárez, P., & Contreras-Cornejo, H. A.** 2018. Trichoderma atroviride promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. *FEMS microbiology ecology*, 94(9), fiy137.
- Mahapatra S, Rayanoothala P, Solanki MK, Das S.** 2020. Wheat microbiome: present status and future perspective. *Phytobiomes: current insights and future vista*, 191-223.
- Mahoney, A. K., Yin, C., & Hulbert, S. H.** 2017. Community structure, species variation, and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of different winter wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Frontiers in plant science*, 8, 132.
- Maigniel JP.** 2019. Protocoles d'Expérimentation Céréales à paille Etudes des Bioagresseurs et autres facteurs de régularité de rendement. In: GEVES, ed. 75p.
- Majeed A, Abbasi MK, Hameed S, et al.** 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in microbiology* 6, 198.
- Malalasekera RAP, Sanderson FR, Colhoun J.** 1973. *Fusarium* diseases of cereals: IX. Penetration and invasion of wheat seedlings by *Fusarium culmorum* and *F. nivale*. *Transactions of the British Mycological Society* 60(3) : 453-457.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J.** 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3, 1-3.
- Marella S.** 2011. Bacterial endophytes in sustainable crop production: Applications, recent developments and challenges ahead. *Int J Life Sci Res* 2:46-56.
- Matar, N., Macadre, C., Ammar, G. A., Peres, A., Collet, B., Boustany, N. E., ... & Ratet, P.** 2022. Identification of beneficial Lebanese *Trichoderma* spp. wheat endophytes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1017890.
- Mazliak P.** 1998. Physiologie végétale: croissance et développement. Ed Hermann, 150p
- McMullen M, Bergstrom G, De Wolf E, et al.** 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease* 96:1712-1855.
- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B.** 2017. Molecular diagnostic applications in forensic science. In *Molecular diagnostics* (pp. 371-394). *Academic Press*.
- Mekhlouf A., Bouzerzour H., Dehbi F., Hannachi A.** 2001. Rythme de développement et variabilité de réponses du blé dur (*Triticum durum* Desf.) aux basses températures. Tentatives de sélection pour la tolérance au gel. In *Proceeding Séminaire sur la valorisation des milieux semi-arides*. OEB.
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K.** 2018. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, 32(2), 62-85.
- Mghazli, N., Bruneel, O., Zouagui, R., Hakkou, R., & Sbabou, L.** 2022. Characterization of plant growth promoting activities of indigenous bacteria of phosphate mine wastes, a first step toward revegetation. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1026991.
- Le Mire G, Siah A, Brisset M, et al.** 2018. Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid-and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses. *Agriculture* 8, 11.
- Mitter EK, Tosi M, Obregón D, et al.** 2021. Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: Innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5: 29.
- Mojid MA, Mousumi, KA, Ahmed T.** 2020. Performance of wheat in five soils of different textures under freshwater and wastewater irrigation. *Agricultural Science* 2(2): 89-89.
- Moronta-Barrios F, Gionechetti F, Pallavicini A, et al.** 2018. Bacterial microbiota of rice roots: 16s-based taxonomic profiling of endophytic and rhizospheric diversity, endophytes isolation and simplified endophytic community. *Microorganisms* 6(1): 14.
- Moosa A, Farzand A, Sahi Shahbaz T, Khan SA.** 2017. Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi – 15 years of success. *Israel Journal of Plant Sciences*, 1-17.
- Mui-Yun W.** 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.): PP728 Soil-Borne Plant Pathogen Class Project. North Carolina State University; Raleigh, NC, USA:.

**Murali, M., Naziya, B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., AlYahya, S., Almatroudi, A., ... & Amruthesh, K. N.** 2021. Bioprospecting of rhizosphere-resident fungi: Their role and importance in sustainable agriculture. *Journal of Fungi*, 7(4), 314.

## - N -

**Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ.** 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 479-504.

**Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., ... & Abarenkov, K.** 2015. A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes and environments*, 30(2), 145-150.

## - O -

**Oerke EC.** 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144 (1): 31-43.

**Ofek M, Voronov-Goldman M, Hadar Y, Minz D.** 2013. Host signature effect on plant root-associated microbiomes revealed through analyses of resident vs. active communities. *Environ Microbiol* 16:2157-2167.

**Oita S, Carey J, Kline I, et al.** 2021. Methodological approaches frame insights into endophyte richness and community composition. *Microbial Ecology* doi: 10.1007/s00248-020-01654-y.

**Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA.** 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 45: 119-144.

**Omomowo OI, Babalola OO.** 2019. Bacterial and fungal endophytes: tiny giants with immense beneficial potential for plant growth and sustainable agricultural productivity. *Microorganisms* 7:481.

**Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al.** 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* 9: 1084-1090.

**Ortiz R, Trethowan R, Ferrara GO, et al.** 2007. High yield potential, shuttle breeding, genetic diversity, and a new international wheat improvement strategy. *Euphytica* 157: 365-384.

**O'Callaghan, M.** 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(13), 5729-5746.

## - P -

**Pal KK, Gardener BM.** 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1-25. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02

**Pancaldi D, Tonti S, Prodi A, et al.** 2010. Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia mediterranea* 49(2): 258-266.

**Pandey, V., Ansari, M. W., Tula, S., Yadav, S., Sahoo, R. K., Shukla, N., ... & Tuteja, N.** 2016. Dose-dependent response of *Trichoderma harzianum* in improving drought tolerance in rice genotypes. *Planta*, 243, 1251-1264.

**Pandya, N. D., Desai, P. V., Jadhav, H. P., & Sayyed, R. Z.** 2018. Plant growth promoting potential of *Aspergillus* sp. NPF7, isolated from wheat rhizosphere in South Gujarat, India. *Environmental Sustainability*, 1(3), 245-252.

**Parker JE, Barber CE, Mi-Jiao F, Daniels MJ.** 1993. Interaction of *Xanthomonas campestris* and *Arabidopsis thaliana* : characterization of a gene from *X.c.* pv. *raphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 216-224.

**Patel, J.B.** 2001. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogen Identification in the Clinical Laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6, 313-321.

**Pawlak K, Kołodziejczak M.** 2020. The role of agriculture in ensuring food security in developing countries: Considerations in the context of the problem of sustainable food production. *Sustainability* 13: 5488.

**Pedrero-Méndez A, Insuasti HC, Neagu T, et al.** 2021. Why is the correct selection of *Trichoderma* strains important? The case of wheat endophytic strains of *T. harzianum* and *T. simmonsii*. *Journal of Fungi*; 7:

1087.

- Pellan L.** 2020. Décryptage des mécanismes impliqués dans le biocontrôle des champignons mycotoxinogènes des céréales. Sciences agricoles. Université Montpellier. Français. NNT : 2020MONTG036.
- Pérez-Jaramillo JE, Mendes R, Raaijmakers JM.** 2016. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol Biol.* 90:635-44.
- Petrini O.** 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds) *Microbial Ecology of Leaves*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY.
- Petti, C. A.** 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 44:1108-1114.
- Pfordt A, Gaumann P, Von Tiedemann A.** 2023. Pathogenicity of *Trichoderma afroharzianum* in Cereal Crops. *Pathogens* 12(7): 936.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH.** 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11: 789-799.
- Philipseon MN, Blair ID.** 1957. Bacteria in clover root tissue. *Can J Microbiol* 3:125-129.
- Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, et al.** 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical reviews in microbiology*, 36(3): 221-231.
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, et al.** 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347-375.
- Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, et al.** 2015. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils* 51: 403-415.
- Podgórska A, Burian M, Szal B.** 2017. Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: Apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Front. Plant Sci.* 8: 1353.
- Porrás-Alfaro A, Bayman P.** 2011. Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Ann Rev Phytopathol.* 49: 291-315.

## - Q -

- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY.** 2008 Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 2-18.
- Qi WZ, Zhao L.** 2013. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of Basic Microbiology* 53: 355-364.

## - R -

- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander, et al.** 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect.* 20(1): 1-11.
- Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kang, S. M., & Lee, I. J.** 2015. A comparative study of phosphate solubilization and the host plant growth promotion ability of *Fusarium verticillioides* RK01 and *Humicola* sp. KNU01 under salt stress. *Annals of microbiology*, 65(1), 585-593.
- Rana A, Saharan B, Joshi M, Prasanna R, Kumar K, et al.** 2011. Identification of multitrait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Ann Microbiol*;61:893-900
- Rao, Y., Zeng, L., Jiang, H., Mei, L., & Wang, Y.** 2022. *Trichoderma atroviride* LZ42 releases volatile organic compounds promoting plant growth and suppressing *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings. *BMC microbiology*, 22(1), 1-12.
- Rastoin JL, Benabderrazik EH.** 2014. Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb : Pour un co-développement de filières territorialisées, Ipemed, Col. « Construire la Méditerranée », Paris : 136 pages.
- Reino JL, Guerrero RF, Hernandez-Galan R, Collado IG.** 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7: 89-123.
- Reid K.** 2003. Fertilité des fourrages. Publication du MAAO. Ontario. Canada. Site web: [ag.info.comaf.gov.on.ca](http://ag.info.comaf.gov.on.ca). Canada.

- Rigobelo, E. C., Kandasamy, S., & Saravanakumar, D.** 2023. Plant growth-promoting microorganisms for sustainable agricultural production, volume II. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1179222.
- Rilling JI, Acuña JJ, Sadowsky MJ, Jorquera MA.** 2018. Putative nitrogen-fixing bacteria associated with the rhizosphere and root endosphere of wheat plants grown in an andisol from Southern Chile. *Front Microbiol*;9:2710.
- Rojas EC, Sapkota R, Jensen B, Jørgensen HJL, Henriksson T.** 2020. Fusarium head blight modifies fungal endophytic communities during infection of wheat spikes. *Microb Ecol*;79:397–408.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19: 827-37.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, et al.** 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letter* 278(1): 1-9.

## - S -

- Sagar, A., Thomas, G., Rai, S., Mishra, R. K., & Ramteke, P. W.** 2018. Enhancement of growth and yield parameters of wheat variety AAI-W6 by an organic farm isolate of plant growth promoting *Erwinia* Species (KP226572). *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 11(1), 159-171.
- Samsudin NIP, Magan N.** 2016a. Efficacy of potential biocontrol agents for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisin B1 under different environmental conditions. *World Mycotoxin Journal* 9(2): 205-213.
- Samsudin NIP, Medina A, Magan N.** 2016b. Relationship between environmental conditions, carbon utilisation patterns and Niche Overlap Indices of the mycotoxigenic species *Fusarium verticillioides* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Fungal Ecology* 24: 44-52.
- Sandhya V, Shrivastava M, Ali SZ, et al.** 2017. Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russ. Agricult. Sci.* 43, 22-34.
- Saraf M, Rajkumar S, Saha T.** 2011. Perspectives of PGPR in agri-ecosystems. In: Maheshwari DKK, editor. *Bacteria in agrobiolgy: crop systems*. Heidelberg: Springer-Verlag; p. 361–85.
- Sarrocco, S., Matarese, F., Moncini, L., Pachetti, G., Ritieni, A., Moretti, A., & Vannacci, G.** 2013. Biocontrol of *Fusarium* head blight by spike application of *Trichoderma gamsii*. *Journal of Plant Pathology*, 95(1).
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, et al.** 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 3(3): 430.
- Scherm B, Balmas V, Spanu F, et al.** 2013) *Fusarium culmorum*: Causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular plant pathology* 14(4): 323-341.
- Schillaci, M., Raio, A., Sillo, F., Zampieri, E., Mahmood, S., Anjum, M., ... & Centritto, M.** 2022. *Pseudomonas* and *Curtobacterium* strains from olive rhizosphere characterized and evaluated for plant growth promoting traits. *Plants*, 11(17), 2245.
- Schnyder H, Baum U.** 1992. Growth of the grain of wheat (*Triticum aestivum* L.). The relationship between water content and dry matter accumulation. *European Journal of Agronomy* 1: 51-57.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K.** 2002. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. *Mycol Res* 106:996–1004.
- Schulz B, Boyle C.** 2005. The endophytic continuum. *Mycol Res* 109:661–687.
- Schulz B, Boyle C.** 2006. What are Endophytes? *Microbes Root Endophytes* 26: 1-13.
- Senthil Kumar, C. M., Jacob, T. K., Devasahayam, S., Thomas, S., & Geethu, C.** 2018. Multifarious plant growth promotion by an entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae*. *Microbiol Res*, 207, 153-160.
- Serfling A, Ordon F.** 2014. Virulence and toxin synthesis of an azole insensitive *Fusarium culmorum* strain in wheat cultivars with different levels of resistance to fusarium head blight. *Plant Pathology* 63: 1230-1240.
- Shewry, P. R., & Hey, S. J.** (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food and energy security*, 4(3), 178-202.
- Shi Y, Lou K, Li C.** 2009. Effects of endophytic fungus on sugar content and key enzymes activity in nitrogen and sugar metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Zuowu Xuebao* 35:946–951 (Article in Chinese,

only the abstract was available in English)

- Shigenaga AM, Berens ML, Tsuda K, Argueso CT.** 2017. Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38 164-172.
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F.** 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48: 21-43.
- Silva Santos, S. D., Silva, A. A. D., Polonio, J. C., Polli, A. D., Orlandelli, R. C., Oliveira, J. A. D. S., ... & Pamphile, J. A.** 2022. Influence of plant growth-promoting endophytes *Colletotrichum siamense* and *Diaporthe masirevici* on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Mycology*, 13(4), 257-270.
- Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS.** 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat Rev Microbiol.* 8: 779-790.
- Singh Y, Lal N.** 2016. Isolation and characterization of PGPR from wheat (*Triticum aestivum*) rhizosphere and their plant growth promoting traits in vitro. *I J Biol*;3(2):139-44.
- Singh BK, Trivedi P.** Microbiome and the future for food and nutrient security. 2017. *Microb Biotechnol.* 10:50-3.
- Singh A, Kumar M, Verma S, et al.** 2020. Plant microbiome: Trends and prospects for sustainable agriculture. In: Varma A, Tripathi S, Prasad R. (Eds), *Plant microbe symbiosis*. Springer, Cham, 129-151.
- Singh BK, Trivedi P, Egidi E, Macdonald CA, Delgado-Baquerizo M.** 2020. Crop Microbiome and Sustainable Agriculture. *Nature Reviews Microbiology* 18 (11): 601-602.
- Sitton JW, Cook RJ.** 1981. Comparative morphology and survival of chlamydospores of *Fusarium roseum* 'Culmorum' and 'Graminearum'. *Phytopathology* 71: 85-90.
- Slim A, Piarulli L, Chennaoui Kourda H, et al.** 2019. Genetic structure analysis of a collection of Tunisian durum wheat germplasm. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 3362.
- Smith C, Wayne A.** 1995. Crop Production. *John Wiley and Sons*; 60-62.
- Soltner D.** 2012. Phytotechnie spéciale : les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairies. Sciences et techniques agricoles, 21<sup>ème</sup> Edition. Angers.472 pages.
- Soltner D.** 1990. Les grandes productions végétales : Céréales, plantes sarclées, prairies. Coll. Sciences et Techniques agricoles. 17<sup>ième</sup> Ed. 464 pages.
- Somasegaran P., Hoben H. J.** 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Heidelberg, NY: *Springer*. 10.1007/978-1-4613-8375-8
- Steinberg, C., Lecomte, C., Alabouvette, C., & Edel-Hermann, V.** 2016. Root Interactions with Nonpathogenic *Fusarium oxysporum*: Hey *Fusarium oxysporum*, What Do You Do in Life When You Do Not Infect a Plant?. *Belowground defence strategies in plants*, 281-299.
- Strobel GA.** 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect* 5:535-544.
- Stummer, B. E., Zhang, X., Yang, H., & Harvey, P. R.** 2022. Co-inoculation of *Trichoderma gamsii* A5MH and *Trichoderma harzianum* Tr906 in wheat suppresses in planta abundance of the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* and impacts the rhizosphere soil fungal microbiome. *Biological Control*, 165, 104809.
- Sun X., Kosman E., Sharon A.** 2020. Stem endophytic mycobiota in wild and domesticated wheat: structural differences and hidden resources for wheat improvement. *J Fungi* 6:180.
- Surget A, Barron C.** 2005. Histologie du grain de blé. *Industrie des céréales* 145: 4-7.

- T -

- Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF.** 2004. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 53:1-4.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Tierens KFMJ, Broekaert WF** (1999a) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 121: 1093-1101
- Thuillet AC, Bataillon T, Poirier S, et al.** 2005. Estimation of Long-Term Effective Population Sizes Through the History of Durum Wheat Using Microsatellite Data. *Genetics* 169: 1589-1599.
- Tierens K, Thomma BPHJ, Bari RP, et al.** 2002. *Esa1*, an *Arabidopsis* mutant with enhanced susceptibility to a range of necrotrophic fungal pathogens, shows a distorted induction of defense responses by

reactive oxygen compounds. *The Plant Journal* 29: 131-140

- Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., et al.** 2018. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat. Plant* 4, 247–257. doi: 10.1038/s41477-018-0139-4
- Tomah, A. A., Abd Alamer, I. S., Li, B., & Zhang, J. Z.** 2020. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. *Biological Control*, 145, 104261.
- Trevors JT, Van Elsas JD.** 1997. Microbial Interactions in soil. In: Van Elsas J. D, Trevors J. T. et Wellington E. M. H. (eds) *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 215-243.
- Tranier MS, Pognant-Gros J, Quiroz RDL, et al.** 2014. Commercial biological control agents targeted against plant-parasitic root-knot nematodes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57: 831-841.
- Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, Garbeva P.** 2017. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol*;25(4):280–92.
- Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Jaroszek-Ścisła J.** 2022. *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences* 23(4) : 2329.

## - U -

- Ullah A, Nisar M, Ali H, et al.** 2019. Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103: 7385-7397.

## - V -

- Valente J, Gerin F, Le Gouis J, et al.** 2019. Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Cell Environ.*;43: 246-260.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A.** 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206.
- Vanlauwe B, Descheemaeker K, Giller KE, et al.** 2014. Integrated soil fertility management in sub-Saharan Africa. *Soil Discussion* 1: 1239-1286.
- Van der Ent S, Verhagen BW, Van Doorn R, et al.** 2008. MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146: 1293–1304.
- Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM.** 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sciences* 11: 184-191.
- Van Wees SCM, De Swart EAM, Van Pelt JA, et al.** 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 8711-8716.
- Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM.** 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology* 11(4): 443-448.
- Verma P, Yadav AN, Khannam KS, Panjiar N, Kumar S, et al.** 2015. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Ann Microbiol*.
- Verma P, Suman A.** 2018. Wheat microbiomes: ecological significances, molecular diversity and potential Bioresources for sustainable agriculture. *EC Microbiol* 14(9):641–665.
- Verma M, Mishra J, Arora NK.** 2019. Plant growth-promoting rhizobacteria: Diversity and applications. In: Sobti R, Arora N, Kothari R. (Eds), *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. Singapore: Springer, 129-173.
- Vicente-Serrano SM.** 2006. Spatial and temporal analysis of droughts in the Iberian Peninsula (1910–2000). *Hydrological Sciences Journal* 51: 83-97.
- Villa-Rodriguez, E., Lugo-Enriquez, C., Ferguson, S., Parra-Cota, F. I., Cira-Chávez, L. A., & de los Santos-Villalobos, S.** 2022. *Trichoderma harzianum* sensu lato TSM39: A wheat microbiome fungus that mitigates spot blotch disease of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) caused by *Bipolaris sorokiniana*. *Biological Control*, 175, 105055.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, et al.** 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil*



*Biology and Biochemistry* 40(1): 1-10.

- Vitti, A., Bevilacqua, V., Logozzo, G., Bochicchio, R., Amato, M., & Nuzzaci, M.** 2022. Seed coating with *Trichoderma harzianum* T-22 of Italian durum wheat increases protection against *Fusarium culmorum*-induced crown rot. *Agriculture*, 12(5), 714.
- Vlot AC, Sales JH, Lenk M, et al.** 2021. Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytol* 229: 1234-1250.
- Vorholt JA.** 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol.* 10: 828-840.

## - W -

- Wagacha JM, Muthomi JW.** 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop protection* 26(7): 877-885.
- Wagner MR.** 2022. How hungry roots get their microbes. *Elife* 11: e82391.
- Waines JG, Barnhart D.** 1992. Biosystematic research in *Aegilops* and *Triticum*. *Hereditas* 116(1) : 207-212.
- Wardlaw IF.** 2002. Interaction between drought and chronic high temperature during kernel filling in wheat in a controlled environment. *Annals of Botany* 90: 469-476.
- Wargo, M. J., & Hogan, D. A.** 2006. Fungal—bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current opinion in microbiology*, 9(4), 359-364.
- White JF, Kingsley KL, Zhang Q, et al.** 2019. Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Manag Sci.* 75(10): 2558-2565.
- Wiese MV.** 1977. Compendium of Wheat Diseases. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN.
- Wilson D.** 1995 Endophyte: The Evolution of a Term and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73: 274-276.
- Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC.** Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* 1990; 28:1942-1946
- Winkler K.** 2005. Assessing the risks and benefits of flowering field edges: strategic use of nectar sources to boost biological control. Mémoire de Thesis, Wageningen University, Laboratory of Entomology, The Netherlands. 128 pages.
- Wong LSL, Tekauz A, Leslie D, et al.** 1992. Prevalence, distribution and importance of *Fusarium* head blight in winter in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14:233-238
- Woo SL, Hermosa R, Lorito M, et al.** 2023. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology* 21: 312–326.
- Woźniak, M., Gałązka, A., Tyśkiewicz, R., & Jaroszuk-Ścisel, J.** 2019. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ Test. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5283.

## - Y -

- Yadav AN.** 2018. Biodiversity and biotechnological applications of host-specific endophytic fungi for sustainable agriculture and allied sectors. *Acta Scientific Microbiology* 1:44.
- Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K., Hyakumachi, M., & Shiraishi, T.** 2011. *Talaromyces wortmannii* FS2 emits  $\beta$ -caryphyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 77, 336-341.
- Yin C, Mueth N, Hulbert S, Schlatter D, Paulitz TC, Schroeder K, Prescott A, Dhingra A.** 2017. Bacterial communities on wheat grown under long-term conventional tillage and no-till in the Pacific Northwest of the United States. *Phytobiomes* 1:83–90.
- Yvan Moenne-Loccoz, Agathe Mini, Rohan Richard, Jordan Valente, Claire Prigent-Combaret, et al.** Intéractions racines x rhizobactéries et leur variabilité génétique chez le blé. Sélectionneur Français, 2019, 70, pp.87-93. hal-02964062.
- Yvon S, Brocard S.** 2021. Variétés de blés anciens : variétés du futur ? *France Agro3*. <https://www.franceagro3.org/fr/varietes-de-bles-anciens-varietes-du-futur/>

## - Z -

- Zamioudis C, Pieterse CMJ.** 2012. Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 139-150.
- Zaidi A, Ahmad E, Khan MS, et al.** 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. *Scientia Horticulturae* 193: 231-239.
- Zhang W, Liu D, Liu Y, et al.** 2012. Overuse of phosphorus fertilizer reduces the grain and flour protein contents and zinc bioavailability of winter wheat. *J. Agric. Food Chem.* 65(8): 1473-1482.
- Zhang H, and Sonnewald U.** 2017. Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. *Plant Journal* 90: 839-855.
- Zhang P, Zhu Y, Ma D, et al** 2019. Screening, identification, and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophyte to wheat head blight. *Agronomy.* 9:476.
- Zhao K, Penttinen P, Guan T, et al.** 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Curr Microbiol.* 62(1): 182-90.
- Zheng B-X, Ding K, Yang X-R, Wadaan MAM, Hozzein WN, et al.** 2019. Straw biochar increases the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacterial community for better rape (*Brassica napus*) growth and phosphate uptake. *Sci Total Environ*;647:1113-20.
- Zvereva AS, Pooggin MM.** 2012. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* 4:2578-2597.